

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Efeitos da Injeção Intracerebroventricular de Derivados de Melanocortina sobre
o Comportamento Sexual de Ratos Machos

Renata da Costa Pereira

Porto Alegre, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Efeitos da Injeção Intracerebroventricular de Derivados de Melanocortina sobre
o Comportamento Sexual de Ratos Machos

Renata da Costa Pereira

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion
Co-Orientadora: Prof. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida

Porto Alegre, 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Danilo e Nery, pelo amor e apoio incondicionais, nesta tão importante etapa de minha vida, e principalmente pelos exemplos de dignidade, respeito e responsabilidade.

Ao meu namorado, Evandro Schmitt Dutra, pela inspiração, incentivo e paciência na minha formação profissional. Obrigada por sempre acreditar em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava mais.

Ao meu orientador, Aldo Bolten Lucion, pela inspiração; pela confiança em mim depositada; por sua paciência e tranquilidade, nos momentos em que eu me sentia pressionada e incapaz; por seus ensinamentos de forma humilde e simples, que me inspiravam e motivavam a perseverar e a buscar meus objetivos e os conhecimentos necessários à minha formação de mestre.

À minha co-orientadora, Rosa Maria Martins de Almeida, pela confiança, apoio e pertinentes sugestões em meu trabalho.

Aos pesquisadores, Ken Gruber e Mike Callahan da Bowman Gray School of Medicine, por nos cederem os peptídeos derivados de melanocortina, testados neste estudo.

Às secretárias do PPG Neurociências pela disponibilidade sempre em ajudar.

Aos professores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos e correções feitas ao meu trabalho e à minha conduta na Universidade.

Aos colegas do laboratório 11, pelas dicas, conselhos, ajudas e acolhedor ambiente de trabalho. Dedico um especial obrigado à Silvana e ao Thiago, por tornarem meus dias de experimentos agradáveis e por me auxiliarem nos momentos difíceis; ao Marcelo, pelo exemplo de discrição, competência e gentileza com os colegas; ao Jéferson, por me ajudar com as análises estatísticas e ao Felipe, que foi fundamental no momento mais tenso e conturbado de meu trabalho, pelas sugestões e pelos generosos ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica, Pâmela e Wagner, pela ajuda em alguns experimentos.

A todos que de alguma forma enriqueceram meu trabalho e minha formação como mestre e como pessoa agradeço com sinceridade.

I. SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
I. SUMÁRIO.....	5
II. APRESENTAÇÃO.....	9
III. LISTA DE FIGURAS	10
IV. LISTA DE TABELAS.....	12
V. LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
VI. RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Pró-Opiomelanocortina (POMC)	18
1.2. O Sistema Melanocolinérgico	19
1.3. Receptores de Melanocortinas.....	20
1.4. Sistema de Melanocortinas e o Metabolismo Energético.....	22

1.5.	Sistema de Melanocortinas e a Ereção Peniana.....	23
1.6.	O Melanotan	24
2.	JUSTIFICATIVA	26
3.	OBJETIVOS.....	28
3.1.	Objetivo Geral	28
3.2.	Objetivos Específicos	28
4.	Materiais e Métodos	30
4.1.	Animais.....	30
4.2.	Grupos Experimentais	31
4.3.	Grupos Auxiliares.....	31
4.4.	Procedimentos Pré-cirúrgicos.....	32
4.4.1.	Pesagem.....	32
4.4.2.	Anestesia.....	32
4.5.	Protocolo Experimental	32
4.5.1.	Ovariectomia (OVX)	32
4.5.2.	Indução de receptividade sexual.....	33
4.5.3.	Cirurgia estereotáxica	33
4.5.4.	Microinjeções dos fragmentos testados.....	34
4.6.	Testes Comportamentais	35
4.6.1.	Teste de Avaliação do Desempenho Sexual.....	36
4.6.2.	Teste de Avaliação da Motivação Sexual.....	37
4.7.	Análise Histológica.....	40
4.8.	Delineamento Experimental.....	40

4.8.1.	Delineamento Experimental: Teste Desempenho Sexual.....	40
4.8.2.	Delineamento Experimental: Teste Motivação Sexual.....	40
4.9.	CrITÉRIOS de exclusão da amostragem	42
4.10.	Análise Estatística	42
4.11.	Manuseio de reagentes e destino dos resÍduos da pesquisa.....	43
5.	RESULTADOS	44
5.1.	Teste Desempenho Sexual.....	44
5.1.1.	Ocorrência ou não de ereção peniana.....	44
5.1.2.	Soma do número de ereções em cada grupo.....	45
5.1.3.	Média do número de ereções em cada grupo	45
5.1.4.	Média de ereções por grupo entre os animais com ereção	46
5.1.5.	Latência para a primeira ereção.....	47
5.1.6.	Latência para a primeira ereção em animais com ereção	47
5.1.7.	Correlação entre a latência e o número de ereções.....	48
5.2.	Teste de Motivação Sexual.....	49
5.2.1.	Amostra do Teste Motivação Sexual.....	49
5.2.2.	Motivação sexual na região das grades	50
5.2.3.	Motivação Sexual na região das paredes.....	52
5.2.4.	Motivação Sexual entre os Lados	53
5.2.5.	Manipular ou lambe a região genital (GE).....	54
5.2.6.	Prática de <i>Grooming</i> (GR).....	57
5.2.7.	PerÍodo ND	58
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÕES	63

8.	PERSPECTIVAS	64
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
10.	ANEXOS.....	58

II. APRESENTAÇÃO

Este estudo decorreu da execução do projeto de número 19421, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (anexo).

Esta dissertação teve por objetivo testar a ocorrência de ereções penianas espontâneas após a injeção intracerebroventricular de um derivado de melanocortina chamado melanotan I em ratos machos adultos. Além deste efeito, foi analisada a motivação ou preferência sexual, visto que não foram encontrados trabalhos anteriores, na literatura, sobre a ação dos derivados de melanocortina neste comportamento em ratos machos adultos.

A dissertação apresenta uma introdução, a qual descreve a ação do sistema melanocolinérgico e sua correlação aos comportamentos alimentar e sexual. A metodologia descreve os grupos de animais testados, os procedimentos cirúrgicos e histológicos e os testes realizados. Ela também descreve o tipo de análise estatística e os critérios de exclusão adotados. Além disso, estão expostos os resultados deste estudo, obtidos a partir dos testes comportamentais e a discussão e a conclusão dos mesmos.

Por fim, esta dissertação contém as perspectivas para outros estudos a serem realizados a partir dos resultados obtidos neste trabalho e as referências bibliográficas, as quais listam os trabalhos utilizados para a elaboração da metodologia e discussão dos resultados deste estudo.

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características dos receptores de melanocortinas.....	21
Figura 2 – Esquema dos grupos experimentais.....	35
Figura 3 – Ilustração esquemática da caixa para observação do desempenho sexual.....	36
Figura 4 - Fotografia da caixa de teste de desempenho sexual.....	37
Figura 5 – Desenho esquemático da caixa de teste de motivação ou preferência sexual.....	38
Figura 6 – Fotografia da caixa de teste de motivação ou preferência sexual.....	39
Figura 7 – Esquema delineamento experimental teste de desempenho sexual.....	40
Figura 8 – Esquema Delineamento Experimental Teste de Motivação Sexual para os machos.....	41
Figura 9 - Esquema delineamento experimental teste de motivação sexual para as fêmeas sexualmente ativas.....	41
Figura 10 – Esquema Delineamento experimental teste de motivação sexual para as fêmeas sexualmente não-ativas.....	41
Figura 11 – Porcentagem de animais com ereção em cada grupo.....	45
Figura 12 – Média de ereções ocorridas em cada grupo.....	46

Figura 13 – Média da latência \pm EPM para ocorrência da primeira ereção em segundos e em cada grupo.....	47
Figura 14 – Dispersão dos dados de latência para a primeira ereção x número total de ereções no grupo MT-I	48
Figura 15 – Dispersão dos dados de latência para a primeira ereção x número total de ereções no grupo MT-II.....	49
Figura 16 – Comparação da média \pm EPM do tempo, em cada grupo, em que os animais cheiram a grade da fêmea ativa ao tempo em que cheiram a grade da fêmea não ativa.....	51
Figura 17 – Comparação da média do tempo, em cada grupo, em que os animais permanecem cheirando o lado da fêmea ativa ao tempo em que cheiram o lado da fêmea não ativa.....	54
Figura 18 – Média \pm EPM da frequência de manipulações e/ou lambidas na região genital (GE).....	55
Figura 19 – Média \pm EPM do tempo de manipulações e/ou lambidas na região genital (GE).....	56
Figura 20 – Média da latência \pm EPM para ocorrência de GE.....	57

IV. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela do coeficiente de correlação de Pearson.....	43
Tabela 2 – Média do tempo em segundos para cada um dos grupos do Teste de motivação sexual.....	50

V. LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

AgRP - proteína relacionada ao *agouti*

ANOVA – análise de variância

CE – ciclo claro-escuro

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

EPM – erro padrão da média

EXPS – experiência sexual

FSA – grupo fêmeas sexualmente ativas

FSNA – grupo fêmeas sexualmente não-ativas

GA = grade da caixa em que estava a fêmea sexualmente ativa

GN = grade da caixa em que estava a fêmea sexualmente não-ativa

GE = manipular ou lambe a região genital

GR = *grooming*

ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ICV – intracerebroventricular

LA – lado da caixa em que estava a fêmea sexualmente ativa

LN – lado da caixa em que estava a fêmea sexualmente não-ativa

LNC - laboratório de neuroendocrinologia do comportamento

MT-I – melanotan I

MT-II – melanotan II

ND – tempo restante, quando o animal executou comportamentos que não foram avaliados

NPV – núcleo paraventricular

NPY – neuropeptídeo Y

PA - parede da caixa em que estava a fêmea sexualmente ativa, exceto a região da grade do mesmo compartimento

PN - parede da caixa em que estava a fêmea sexualmente não-ativa, exceto a região da grade do mesmo compartimento

POMC – pró-opiomelanocortina

SME – sistema das melanocortinas endógenas

SNC – sistema nervoso central

TMS – teste de motivação sexual

TDS – teste de desempenho sexual

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Vs- versus

α -MSH – hormônio estimulante de melanócitos, fração alfa

β -MSH - hormônio estimulante de melanócitos, fração beta

γ -MSH – hormônio estimulante de melanócitos, fração gama

VI. RESUMO

Existem 2 análogos sintéticos do hormônio estimulante de melanócitos na fração alfa (α -MSH): o melanotan I (MT-I) e o melanotan II (MT-II). O MT-II é uma droga utilizada comercialmente que age sobre o metabolismo energético, relacionando-se principalmente com o controle da ingestão alimentar e da massa corporal. Além desses efeitos, em seres humanos e em roedores, é capaz de produzir ereção peniana de forma espontânea. As funções do MT-I são menos conhecidas. Este estudo verificou a ação do análogo do MT-II, o Melanotan I, pela realização dos testes de Preferência ou Motivação Sexual e Desempenho Sexual. Foram avaliados 3 grupos (grupo teste – injetado intracerebroventricularmente - ICV- com 1 μ g de melanotan I diluído em 5 μ l de água destilada, grupo controle – injetado ICV com 1 μ g de melanotan II diluído em 5 μ l de água destilada e grupo controle negativo – injetado ICV com 1 μ g de γ -MSH diluído em 5 μ l de água destilada). O teste de desempenho sexual verificou que o MT-I foi capaz de produzir ereções penianas nos animais avaliados, porém em menores proporções (36% dos animais) que o conhecido análogo MT-II (65% dos animais testados). A média do total de ereções (\pm EPM), ocorridas durante os 60 minutos de observação após a injeção do MT-I, também se revelou inferior à provocada após a injeção do MT-II (1,6 \pm 0,6 versus 5,2 \pm 1,1). Observou-se que o MT-I reduziu a preferência sexual do macho por fêmea sexualmente ativa, uma medida de motivação

sexual. O conjunto dos resultados deste trabalho permite concluir que o MT-I atua sobre o circuito neural do comportamento sexual de ratos machos, no entanto de forma menos efetiva que o MT-II com relação ao desempenho sexual (ereção). O MT-I injetado intracerebroventricularmente (ICV) surpreendentemente afetou negativamente a motivação sexual, nem o MT-II nem o γ -MSH afetaram esse comportamento.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pró-Opiomelanocortina (POMC)

A pró-opiomelanocortina (POMC) é mais bem conhecida como pró-hormônio de ACTH e β -endorfina. Ela é altamente expressa por corticotrofinas do lobo anterior da pituitária e em melanocortinas do lobo intermediário desta. No entanto, é também expressa em outras partes do sistema nervoso central (SNC), como o núcleo arqueado do hipotálamo, o núcleo do trato solitário e em tecidos extracranianos, incluindo: pele, testículos, tireóide, placenta, pâncreas, rim e fígado (Humphreys, 2004; De Bold *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988).

O processamento da POMC em peptídeos ativos é dirigido por 2 enzimas pró-hormônio convertases: PC1 e PC2. A PC1 é expressa predominantemente no lobo anterior corticotrófico e somente uma pequena extensão no lobo intermediário; ela cliva POMC em grandes peptídeos, incluindo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a β -lipotropina, e o grande fragmento NH₂-terminal. A PC2 é mais predominante em melanocortinas no lobo intermediário, mas é também expressa, em baixos níveis, no lobo anterior hipofisiário. Sua ação dá origem a pequenos peptídeos: β -endorfina e os hormônios estimulantes de melanócitos frações α , β e γ (Zhou *et al.*, 1993; Humphreys, 2004).

As moléculas dos hormônios: Hormônio Estimulante de Melanócito fração alfa (α -MSH) e Hormônio Estimulante de Melanócito fração beta (β -MSH) foram identificadas, em 1950, devido a sua ação de induzir à dispersão de pigmentos, em melanócitos da pele de anfíbios e répteis. Elas têm sido altamente conservadas durante o desenvolvimento evolucionário, embora muitas de suas funções, em mamíferos, ainda permaneçam obscuras (Humphreys, 2004).

O hormônio estimulante de melanócito fração gama (γ -MSH) é derivado da sequência N-terminal, enquanto o α -MSH e o β -MSH são derivados do carboxi-terminal (Smith *et al.*, 1988; Slominski *et al.* 1992, Eberle, 1988).

1.2. O Sistema Melanocolinérgico

As melanocortinas compreendem um grupo de peptídeos naturais, os quais são derivados da molécula precursora pró-opiomelanocortina (POMC) (Hadley *et al.*, 1999). O Sistema das Melanocortinas Endógenas (SME) inclui peptídeos, receptores e antagonistas de melanocortinas, além de duas proteínas acessórias (*agouti* e proteína relacionada *agouti*) (Chen *et al.*, 2009). O sistema de melanocortinas tem um importante papel na regulação da fisiologia e patofisiologia animal (Cone, 2006). O SME está envolvido, normalmente, na regulação da pigmentação da pele, da temperatura corporal, da esteroidogênese, da obesidade, da secreção exócrina, da analgesia, da inflamação, da imunomodulação, da homeostase de energia e das funções sexual, cardiovascular e neuromuscular (Heaton *et al.*, 2004).

Esta família de peptídeos possui semelhança estrutural com uma sequência de tetrapeptídeos, característica e invariável (His-Phe-Arg-Ala), em seu núcleo, como um requisito absoluto para a ligação e atividade nos receptores de melanocortina (Haskell-Luevano *et al.*, 1999). Todos os peptídeos agonistas de melanocortinas contêm a sequência His-(L/D)Phe-Arg-Trp, que é considerada uma sequência-mensagem, responsável pela seletividade e ativação de receptores de melanocortinas (Holdert *et al.*, 2004; Irani 2004). A conformação bioativa de peptídeos agonistas envolve uma dobra do tipo β (β -turn) no His-(L/D)Phe-Arg-Trp principal (Holdert *et al.*, 2004; Irani 2004), que serve, provavelmente, como estrutura organizadora, para direcionar as cadeias

laterais da sequência-mensagem, na melhor orientação para a interação com o receptor (Chen *et al.*, 2009).

Extensivos estudos da estrutura-função do α -MSH criaram análogos dos peptídeos de melanocortina mais potentes e resistentes à enzimas, que incluem os agonistas sintéticos NDP-MSH[Nle⁴,DPhe⁷]- α -MSH e melanotan II; e antagonistas como SHU9119 e HS204 (Saweyer *et al.*, 1980; Sawyer *et al.*, 1982; Schioth *et al.*, 1997).

Portanto, os diversos efeitos citados ocorrem através da ativação seletiva de cinco subtipos de receptores (MCRs) para peptídeos, pertencentes aos receptores acoplados à proteína G (Heaton *et al.*, 2004).

1.3. Receptores de Melanocortinas

Uma propriedade do sistema de melanocortina é a existência de antagonistas endógenos dos receptores de melanocortina (Lu *et al.*, 1994).

Os receptores são derivados da modificação ocorrida após a tradução dos produtos do gene POMC (King *et al.*, 2007) e estão ligados à proteína G, com 7 alças transmembranas, que estimulam a adenilato-ciclase e se encontram amplamente distribuídos em tecidos periféricos e no SNC (Catania *et al.*, 2000). Muitas das características estruturais, conservadas em outros receptores acoplados à proteína G, são encontradas nos receptores de melanocortina, como: sítios de N-glicosilação perto do terminal amino, uma palmitoilação local na cauda COOH-terminal e locais de fosforilação nos primeiro e terceiro domínios intracelulares, e na cauda COOH-terminal (Chen *et al.*, 2009).

Os receptores de melanocortina estão implicados em uma série de ações fisiológicas diferentes. Cada subtipo de receptor tem um diferente padrão de expressão tecidual no SNC e em tecidos periféricos, e cada receptor tem seu perfil de segmentos próprios em relação à potência dos peptídeos de melanocortinas sintéticos e endógenos (Gantz *et al.*, 1994) (Figura 1).

Receptor	Ligantes	Distribuição nos tecidos	Funções
MCR1	α -MSH > β -MSH > γ -MSH > ACTH	Melanócitos, macrófagos	Pigmentação da pele e modulação imunológica
MCR2	ACTH	Córtex adrenal	Esteroidogênese
MCR3	γ 1-MSH = γ 2-MSH = α -MSH = β -MSH > γ 3-MSH	Hipotálamo, tálamo e outras regiões encefálicas, rim, intestino, placenta e coração	Metabolismo de sódio, regulação da pressão sanguínea e homeostase da energia
MCR4	α -MSH = β -MSH > ACTH > γ -MSH	Encéfalo, medula-espinhal	Metabolismo energético e ingestão de alimentos
MCR5	α -MSH = ACTH > β -MSH > γ -MSH	Córtex adrenal, encéfalo, baço, pulmão, glândulas exócrinas	Função de glândulas sebáceas

Figura 1 – Características dos Receptores de Melanocortinas (Adaptado de Humphreys, 2004).

O MCR1 é expresso principalmente em melanócitos e monócitos, desempenhando um importante papel na pigmentação e nas reações anti-inflamatórias (Gantz *et al.*, 1994). Já o MC2R é expresso principalmente na glândula adrenal estando envolvido na esteroidogênese e na lipogênese de adipócitos (Mountjoy *et al.*, 1992).

Os receptores MCR3 e MCR4 são expressos no hipotálamo, e atuam na regulação da ingestão de alimentos e no controle do peso corporal (Fan *et al.*, 1997; Huszar *et al.*, 1997). O receptor 3 da melanocortina (MCR3) é expresso principalmente no SNC (hipotálamo e sistema límbico), é encontrado em neurônios do núcleo arqueado conhecidos por expressar POMC e também, na placenta, intestino, timo e adipócitos (Roselli-Reh fuss *et al.*, 1993; van Der Kraan *et al.*, 1998).

MCR5 é expresso em glândulas exócrinas e está envolvido na regulação da função destas glândulas (Gantz *et al.*, 1994).

1.4. Sistema de Melanocortinas e o Metabolismo Energético

Mutações nos receptores de melanocortinas têm sido identificadas como causas de obesidade em humanos (Humphreys, 2004). Descobriu-se que deleções alvo do receptor MCR3 resultam em adiposidade aumentada devido à diminuição do gasto de energia sem afetar significativamente a ingestão de alimentos. Mutações no MCR3 também têm sido identificadas, mas muitas tentativas de associá-las diretamente a obesidade não tiveram sucesso (Lee *et al.*, 2002).

Estudos com camundongos com *knock out* do gene da POMC (*chubby mice*) e com camundongos *ob/ob* sugerem que o MCR3 expresso em adipócitos seja importante no aumento do gasto energético e na lipólise mediados pelo α -MSH (Forbes *et al.*, 2001; Stephenson *et al.*, 1999). O MCR3 também parece ter um efeito auto-regulatório, pois é expresso nos neurônios que expressam POMC e neuropeptídeo Y (NPY) / proteína relacionada *agouti* (AGRP) (Cowley *et al.*, 2001). Foi descrita uma mutação no gene do MCR3 em humanos com obesidade severa, porém, na mesma família, outros obesos não apresentaram a mutação (Lee *et al.*, 2002).

Igualmente, mutações no MC4R têm sido descritas em aproximadamente 1-7% das pessoas com obesidade mórbida e estão particularmente associadas com a obesidade grave, estatura alta e hiperinsulinemia (Korner *et al.*, 2004). Vaisse *et al.* (2000) encontraram esta mutação em 4% de uma população de indivíduos obesos. Além disso, a estimulação do MCR4 diminui a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético (Korner *et al.*, 2004). A severidade da obesidade correlacionou-se, *in vitro*, com a atividade do mutante MCR4 (Farooqi *et al.*, 2003) e a compulsão alimentar tem sido identificada como um fenótipo de mutação no gene MC4-R (Branson *et al.*, 2003). O MCR4 é densamente encontrado no hipotálamo e a ativação desse receptor pelo α -MSH reduz a ingestão alimentar (Cone, 1999; Friedman *et al.*, 1998). Mutações no MCR4 representam a desordem genética mais comum presente na obesidade humana de início precoce (O'Rahilly, 2002).

Em camundongos, a inativação de ambas as cópias do gene MCR4 leva a uma síndrome de obesidade, com início na maturidade, associada à hiperfagia, à hiperinsulinemia, à hiperglicemia e ao aumento do crescimento linear, sem alterações da função adrenal nem da capacidade reprodutiva (Rodrigues *et al.*, 2003). Os

“heterozigotos” apresentam peso corporal intermediário entre o peso dos “homozigotos” e aquele dos camundongos “selvagens”, sendo o sexo feminino mais afetado que o sexo masculino (Huszar *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2003). Este fenótipo é semelhante ao observado na obesidade humana, razão que motivou a procura de mutações do MCR4 (O’Rahilly, 2002). As disparidades na prevalência de mutações patogênicas no MCR4 resultam, em parte, das diferenças étnicas e dos critérios de seleção das populações estudadas (List *et al.*, 2003).

Apesar da deficiência de MC4R representar a forma monogênica de obesidade mais prevalente em humanos, as etiologias das formas mais comuns, poligênicas, de obesidade não foram definidas. No entanto, os conhecimentos adquiridos a partir destas mutações têm levado ao desenvolvimento de drogas similares às melanocortinas, que podem ser úteis para outras formas de obesidade (Rodrigues *et al.*, 2003)

1.5. Sistema de Melanocortinas e a Ereção Peniana

A disfunção erétil foi definida como a incapacidade persistente para obter ereção peniana suficiente para a satisfação sexual (National Institutes of Health, 1993). Em roedores machos, o comportamento sexual é um comportamento que envolve gratificação e reforço, composto por vários elementos, incluindo a investigação anogenital, montagens, intromissões e ejaculação (Pfaus e Philips, 1991).

O SNC é o centro primário do controle da motivação sexual e ereção peniana (Giuliano and Rampin, 2000; Andersson, 2001). E, atualmente, diversos estudos têm apontado a participação do sistema melanocolinérgico sobre o comportamento sexual.

As melanocortinas regulam o comportamento sexual, incluindo a ereção peniana, a motivação sexual e a secreção de atrativos sexuais pela glândula prepucial (van der Kraan *et al.*, 1998). O α -MSH e o ACTH têm sido implicados, também, no controle da ereção peniana e comportamento sexual em animais (Wessells *et al.*, 2000).

A administração central de α -MSH e ACTH em ratos induz a ereção peniana devido à ação em regiões em volta do terceiro ventrículo (Wessells *et al.*, 2003). A região hipotalâmica específica em que o α -MSH atua promovendo a ereção peniana inclui: o núcleo paraventricular (NPV), núcleo dorso-medial, núcleo ventro-medial e área anterior hipotalâmica (Argiolas *et al.*, 2000; Wessells *et al.*, 2003).

Contudo, existem conflitantes observações sobre os subtipos de receptores de melanocortina envolvidos na função sexual (Giuliano, 2004). O receptor MCR5 expresso em tecidos periféricos atua no controle funcional central e periférico do comportamento sexual (van der Kraan *et al.*, 1998). Estudos clínicos a respeito de agonistas do MC4R parecem confirmar que esta via é um destino útil para a modulação da função sexual humana (Heaton *et al.*, 2004). Embora limitado ao sistema nervoso, o MCR4, quando bloqueado parcialmente, abole a ereção induzida pela injeção de α -MSH em ratos (Vergoni *et al.*, 1998; Wessells *et al.*, 2000). Acredita-se, ainda, que provavelmente ocorra um sinergismo entre os receptores MCR3 e o MCR4 no controle desta função, porque a estimulação concomitante de cada subtipo parece produzir maior ativação da atividade erétil (Avis, 2000).

O análogo PBIII-93 do agonista específico de receptores MCR3, γ -MSH, quando administrado ICV em ratos machos, não conseguiu produzir ereções (Grieco *et al.*, 2000). Logo, a inibição dos receptores MCR3 não estimula a ereção, mas pode facilitar a ereção iniciada pela ativação dos receptores MCR4. Ou seja, uma vez ocupado o MCR3, o antagonista permite que uma maior quantidade de MT-II possa ligar-se ao MCR4 (King *et al.*, 2007). No entanto, os mecanismos subjacentes que intermediam os efeitos pró-eréteis das melanocortinas ainda são mal compreendidos (Giuliano, 2004).

Porém, o reconhecimento de que a manipulação - dos diferentes subtipos de receptores específicos das melanocortinas - poderia levar a resultados fisiológicos desejados, fez surgir novos estudos e o desenvolvimento de compostos sintéticos capazes de produzir efeitos terapêuticos.

1.6. O Melanotan

Existem dois análogos sintéticos do α -MSH (Hadley *et al.*, 2006; Mahiques-Santos, 2011):

- melanotan I ([Nle4-D-Phe7]- α -MSH) – um peptídeo linear de 13 aminoácidos no qual o quarto aminoácido, a metionina, é substituído por norleucina, e o sétimo aminoácido, L-fenilalanina, é substituído por D-fenilalanina. Esta molécula é mais resistente à degradação do que seu análogo natural e isso faz com que o estímulo

produzido sobre seu receptor, principalmente o MCR1, seja mais potente (Mahiques-Santos, 2011).

- melanotan II (Ac-Nle-[Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-a-MSH- NH₂) - uma variante mais curta com um anel lactâmico que, igualmente ao anterior, é mais potente que o α -MSH natural, possui mais efeitos secundários por apresentar menor especificidade por um determinado receptor, ou seja, o MT-II é capaz de induzir efeito em vários receptores de melanocortina. Esta molécula produz, além do aumento de melanogênese, diminuição de apetite e aumento da potência sexual (Mahiques-Santos, 2011).

A administração central do melanotan II (MT-II) foi capaz de diminuir significativamente a ingestão de alimentos em quatro modelos experimentais de ratos diferentes, incluindo ratos com um sistema de leptina-melanocortina interrompido (ob / ob mice e Ay) (Fan *et al.*, 1997).

O melanotan II inicia ereções em ratos, cachorros e seres humanos com disfunção erétil em 69% das administrações nos homens (Wessells *et al.*, 2000). Além disso, os estudos com o MT-II têm ajudado a melhor compreender o papel fisiológico dos receptores MCR3 e MCR4 no controle da ereção peniana (Giuliano, 2004).

Neste estudo, o γ -MSH foi utilizado como controle negativo, devido a sua ação como agonista endógeno dos receptores de melanocortinas e, principalmente, por não atuar diretamente sobre o comportamento sexual (king *et al.*, 2007; Grieco *et al.*, 2000) e o MT-II como controle positivo, pois é a atuação dele que será comparada à do MT-I.

2. JUSTIFICATIVA

O sistema melanocolinérgico está envolvido em diferentes funções regulatórias (Heaton *et al.*, 2004) e, por isso, os mecanismos que envolvem a ativação de seus receptores por ligantes endógenos ou sintéticos têm suscitado estudos. Sabe-se que o MT-II, um agonista sintético de melanocortina, produz a perda de peso e a diminuição de apetite quando administrado cronicamente em humanos. No entanto, foi verificado que esse agonista também induz ereções penianas de forma espontânea, tornando este efeito indesejado. Por outro lado, o agonista análogo, MT-I, supostamente provoca o mesmo efeito no metabolismo energético, sem, contudo, causar ereção peniana.

O melanotan é reconhecido por estimular a ereção peniana e o desejo sexual em homens, porém ainda não está bem claro, de que forma ele age sobre os MCRs causando o efeito pró-erétil da droga.

Os experimentos realizados e descritos nesta dissertação fazem parte de um estudo mais amplo que envolve outros grupos nos EUA que têm analisado efeitos dos peptídeos derivados das melanocortinas. O grupo da Bowman Gray School of Medicine, Carolina do Norte (EUA), foi quem forneceu os fragmentos de peptídeos que permitiram a realização deste trabalho.

Neste estudo, foi testado o efeito do MT-I sobre o comportamento sexual de ratos machos adultos, que foi comparado às ações do MT-II e γ -MSH.

Desta forma, esperava-se contribuir para um melhor entendimento da atuação dos derivados de melanocortina no sistema nervoso central sobre o comportamento sexual de ratos machos adultos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atuação da droga testada, o melanotan I (MT-I), sobre o comportamento sexual de ratos machos adultos, após sua injeção intracerebroventricular (ICV).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade dos peptídeos derivados de melanocortina (MT-I, MT-II e γ -MSH) testados produzirem ereções penianas espontâneas após injeção ICV.
- Avaliar a frequência de ereções e a latência para a primeira ocorrência de ereção após injeção ICV de cada uma dos peptídeos avaliadas.
- Avaliar a ação individual dos mesmos peptídeos derivados de melanocortina sobre a preferência sexual de ratos machos entre uma fêmea receptiva sexualmente e uma não-receptiva.
- Avaliar as médias da frequência, latência e tempo de manipulação ou lambedura da região genital praticada pelos animais sob efeito dos derivados da melanocortina.

- Avaliar a frequência, a latência e o tempo médio despendido em cada grupo de ratos machos para a prática de *grooming*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados para os grupos comportamentais 150 ratos machos adultos de aproximadamente 80 dias de idade e peso aproximado de 230g, da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O cálculo do tamanho da amostra (n) baseou-se em outros estudos semelhantes com nível de significância $p < 0,05$ e poder de 80%. Estes, ao serem transportados ao Biotério Setorial do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento (LNC) do Departamento de Fisiologia do ICBS da UFRGS, foram nele mantidos, separados por sexo e agrupados em 5, em caixas-residência, com água e ração padronizada *ad libitum* (*Rodent Show*, Nutrilab, Colombo, Brasil).

As caixas-residência eram de polipropileno, cobertas com grades metálicas, medindo 60 x 50 x 22 cm (quando continham 5 animais) ou medindo 30 x 19 x 13 cm (quando continham apenas 1 animal, durante a recuperação das cirurgias). As caixas eram limpas duas vezes por semana e forradas com volume padronizado de maravalha seca e auto-clavada. Os mesmos eram acondicionados em ciclo de luz “claro-escuro” (CE) 12:12 h, desligadas as 17:00 horas, em temperatura controlada $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um

período não inferior a 30 dias antes de serem colocados nas diferentes situações experimentais.

Todos os procedimentos estiveram de acordo com as orientações éticas no uso de animais experimentais, conforme orientação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, cada animal testado foi utilizado em apenas um experimento.

4.2. Grupos Experimentais

Para análise dos efeitos do MT-I (grupo teste) foram utilizados 2 grupos controles (MT-II e γ -MSH) injetados com substâncias de moléculas semelhantes a injetada no grupo teste. Além disso, todas as soluções injetadas nos animais estudados tinham a mesma concentração e foram diluídas no mesmo veículo – água destilada.

Os grupos experimentais deste estudo foram:

- Grupo γ -MSH (Grupo Controle Negativo) - Composto por ratos machos injetados com 1 μ g de γ -MSH diluído em 5 μ l de água destilada.
- Grupo MT-II (Grupo Controle Positivo) - Composto por ratos machos injetados com 1 μ g de MT-II diluído em 5 μ l de água destilada.
- Grupo MT-I (Grupo Teste) - Composto por ratos machos injetados com 1 μ g de MT-I diluído em 5 μ l de água destilada.

4.3. Grupos Auxiliares

Os grupos auxiliares deste estudo foram:

- Grupo fêmeas sexualmente ativas (FSA) – composto por ratas ovariectomizadas de aproximadamente 90 dias de idade, que receberam terapia hormonal substitutiva.
- Grupo fêmeas sexualmente não-ativas (FSNA) – composto por ratas ovariectomizadas de aproximadamente 90 dias de idade, sem terapia hormonal substitutiva.
- Grupo machos para teste receptividade sexual - Foram utilizados também alguns animais machos adultos com experiência sexual.

4.4. Procedimentos Pré-cirúrgicos

4.4.1. Pesagem

Todos os animais foram pesados em balança digital imediatamente antes de qualquer procedimento cirúrgico, para a quantificação correta da dosagem de anestésico a ser injetada.

4.4.2. Anestesia

Para a anestesia foi utilizado o pré-anestésico xilazina, que atua como relaxante muscular e analgésico central e o cloridrato de ketamina, o qual atua como anestésico dissociativo. Tais medicamentos foram aplicados, via intraperitoneal, nas doses de 100 mg/kg/rato de ambas drogas para a estereotaxia (Veiga *et al*, 2007) e 100mg/kg de ketamina e 20 mg/kg xilazina para a ovariectomia. Experimentos prévios de estereotaxia no laboratório (Veiga *et al*, 2007) mostram que esse protocolo anestésico é mais efetivo e duradouro para esta cirurgia, comparado ao protocolo de 100mg/kg de ketamina e 20 mg/kg xilazina.

4.5. Protocolo Experimental

4.5.1. Ovariectomia (OVX)

As fêmeas após anestesia eram posicionadas em decúbito-ventral. Em seguida, eram realizadas a tricotomia e a antissepsia da área operatória com álcool iodado. A seguir, procediam-se as incisões cutâneas bilaterais, divulsão do tecido muscular, acesso aos ovários e excisão dos mesmos. Os ovários eram retirados após a ligadura entre essas duas estruturas abaixo da trompa uterina e seus vasos amarrados. Por fim, o tecido muscular e a pele eram suturados por planos.

Ao término da cirurgia as fêmeas eram envolvidas em papel alumínio e colocadas individualmente em caixas de polipropileno, até a recuperação da anestesia quando, então, era retirado o papel alumínio e eram levadas para o biotério. A utilização de papel alumínio foi adotada para diminuir os possíveis efeitos causados pela hipotermia em animais anestesiados.

Passados 5 dias, uma vez constatada a cicatrização da ferida cirúrgica, estas ratas eram transferidas para caixas de polipropileno com tampa metálica medindo 60 x 50 x 22 em número de 5 animais por caixa e mantidas nelas até o experimento.

4.5.2. *Indução de receptividade sexual*

As fêmeas sexualmente ativas (FSA) eram utilizadas 21 dias após a ovariectomia, tempo necessário para a eliminação dos hormônios circulantes na corrente sanguínea (Rodrigues-Alves, 2007).

A receptividade sexual das ratas era induzida pela administração de benzoato de estradiol (ESTR) na dose de 2µg/rata, 48 horas antes do teste, e progesterona-Sigma (PROG) na dose de 500µg/rata, mais ESTR na dose de 2 µg/rata, 6 horas antes do início de cada sessão experimental. Além disso, a receptividade era testada colocando-se a fêmea com um macho para teste da receptividade sexual (TRS) na caixa para observação de comportamento sexual, permitindo-se a realização de algumas montas e verificando-se a presença do comportamento de lordose nas ratas, ou seja, a presença simultânea de flexão côncava do dorso, desvio lateral da cauda e extensão do pescoço (Rodrigues-Alves, 2007). Estas ratas eram reutilizadas somente após intervalo mínimo de 10 dias entre uma utilização e outra nos experimentos.

4.5.3. *Cirurgia Estereotáxica*

As cirurgias estereotáxicas foram realizadas nos 3 grupos de animais testados (Grupos: α -MSH, β -MSH e γ -MSH).

Primeiramente, assim que era constatado o efeito anestésico, era realizada a fixação do rato no aparelho estereotáxico. O escalpo era então cortado. A calota craniana era deixada à mostra retirando toda a gordura subcutânea e o epicrânio empregando peróxido de hidrogênio e raspagem com uma espátula. Nesta torre era acoplada a cânula-guia, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável (25 x 7 mm). A cânula era introduzida no ventrículo lateral direito, por convenção adotada em nosso laboratório, visto que o sistema de ventrículos é interligado permitindo a difusão da droga pelo mesmo. Com o auxílio de uma broca odontológica de baixa rotação perfurava-se a calota craniana em duas localidades; uma

na região demarcada onde será introduzida a cânula (1,5 mm lateral a linha média e 1,0 mm posterior ao bregma e 3,5 mm de profundidade) (Wessels *et al.*, 2003) e outra, no hemisfério esquerdo onde era fixado um parafuso óptico. Este parafuso deveria ser fixo antes da introdução da cânula na fenda. A coordenada vertical só podia ser deslocada após a torre ter sido inclinada e o crânio ter sido perfurado. A partir daí, a torre era abaixada até o valor pré-estabelecido. A abertura cirúrgica era fechada com resina odontológica que ao secar formava uma placa ou capacete sobre o crânio. A fixação desta placa era auxiliada pelo parafuso óptico fixado anteriormente. Os animais eram envolvidos em papel alumínio até que o efeito da anestesia fosse extinto.

Após a extinção do efeito anestésico o papel era removido da caixa onde os animais permaneciam, mantidos individualmente (para evitar traumas ou canibalismo), até o dia do experimento.

4.5.4. *Microinjeções dos Fragmentos Testados*

Cada um dos animais dos 3 grupos, recebia, via cânula implantadas no cérebro, quantidades iguais da droga testada, na dose de 1µg solubilizado em 5 µl de água por rato, seguindo protocolo utilizado pelo grupo de pesquisadores que vem estudando e nos forneceu esses peptídeos. Esta dose segundo o estudo de Wessel *et al.* (2003), revelou-se a mais eficaz na produção da ereção peniana após a injeção ICV de MT-II.

As injeções eram realizadas com auxílio de uma seringa de Hamilton, e em sua extremidade era acoplado um tubo de polietileno de 30 cm e uma agulha de anestesia odontológica descartável, de 12 mm de comprimento. Depois de administrados os fragmentos, eram aguardados 30 segundos antes de iniciar lentamente a retirada da agulha injetora, a fim de que fosse garantida a difusão dos fragmentos no ventrículo e fosse evitado o refluxo.

Os efeitos eram avaliados e registrados imediatamente após injeção ICV dos fragmentos de melanocortina durante o Teste de Desempenho Sexual (TDS), já que após a análise feita no estudo piloto um animal apresentou ereção nos primeiros 10 minutos pós-injeção das drogas avaliadas.

Já para o Teste de Motivação Sexual (TMS), a observação era iniciada 20 minutos após a injeção intracerebroventricular, quando então os animais eram colocados

na caixa de teste e filmados. Esta espera de 20 minutos pós-injeção foi determinada através da avaliação do tempo médio de latência para a primeira ereção do estudo-piloto, que foi aos 22 minutos.

4.6. Testes Comportamentais

Os testes ocorriam após as 18:00 horas, ou seja, 1 hora após o ciclo de escuro haver iniciado, garantindo a habituação do animal ao novo ciclo do dia.

Todos os testes e análises foram realizados por um único pesquisador, bem como as cirurgias estereotáxicas, injeção de drogas e histologia, a fim de que os dados fossem obtidos da maneira mais homogênea possível.

Os testes foram filmados e analisados, posteriormente, sempre pelo mesmo pesquisador.

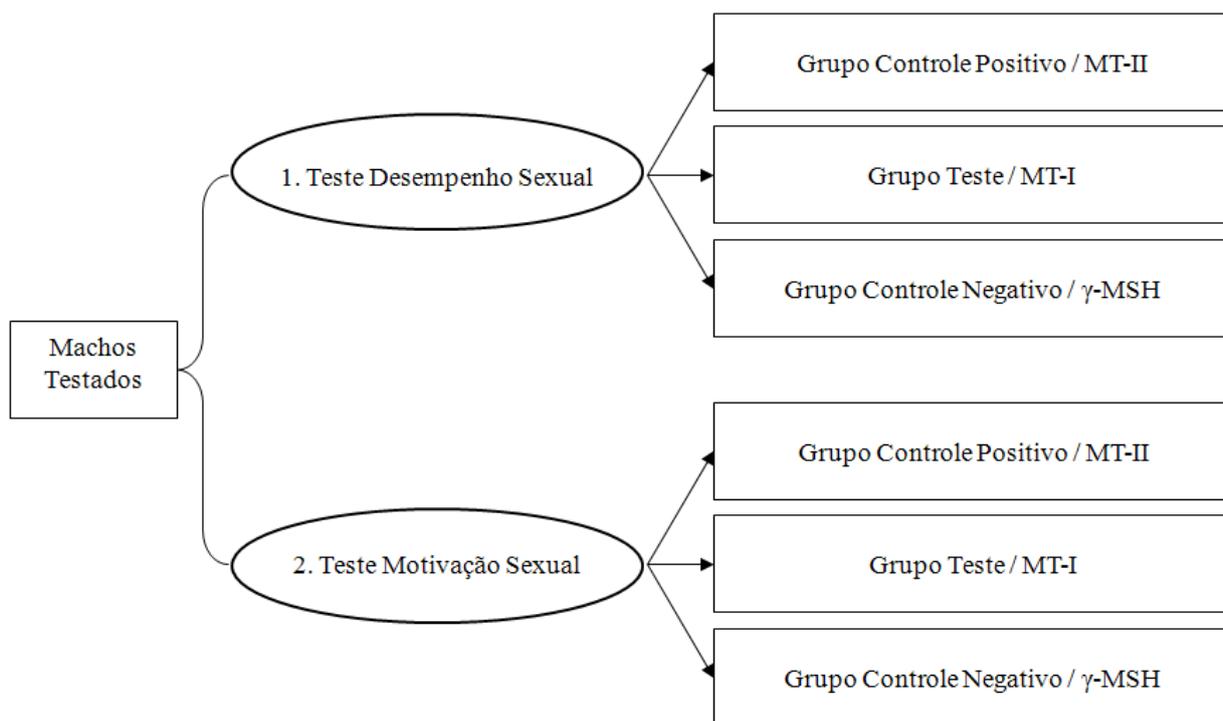


Figura 2 – Esquema dos Grupos Experimentais

4.6.1. *Teste de Avaliação do Desempenho Sexual*

Os machos eram colocados por 5 minutos dentro da caixa-teste para a habituação com a caixa de observação. Em seguida, eram retirados e recebiam a injeção ICV.

Os ratos, logo após a injeção dos derivados de melanocortina, eram colocados em uma caixa acrílica transparente e observados por baixo. Dessa forma era registrado o intervalo de latência até o início da ereção e também a duração da mesma, através da análise da filmagem.

O desempenho sexual era avaliado por meio do teste de ereção peniana realizado em uma caixa de vidro medindo 30 x 30 x 30 cm, com a parede posterior de espelho. Esta caixa ficava apoiada em quatro pés de metal com 10 cm de altura, sobre um espelho plano com 40 x 40 cm (Rodrigues-Alves, 2007) (figura 3).

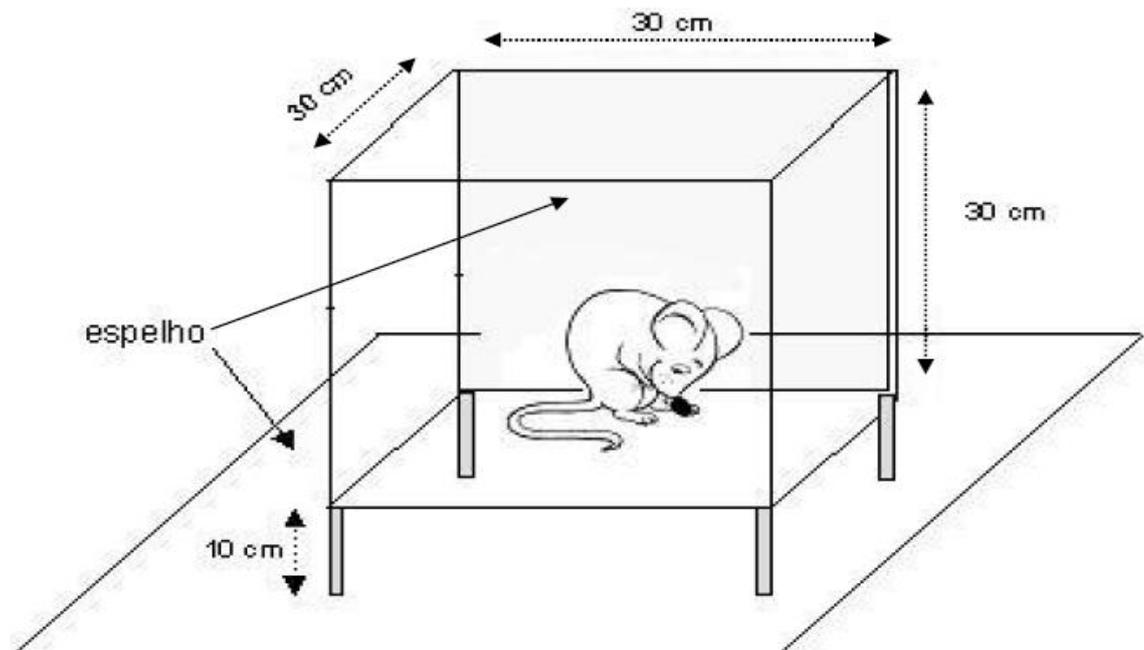


Figura 3 – Ilustração esquemática da caixa para observação do Desempenho Sexual retirada de Rodrigues-Alves, 2007.

Os animais eram colocados individualmente na caixa após a aplicação das drogas teste e observados por 1 hora. A câmera filmadora era direcionada para o espelho inferior, garantindo a observação do momento em que ocorria cada ereção através da imagem refletida no espelho (figura 4).



Figura 4 - Fotografia da Caixa de Teste de Desempenho Sexual

Considerava-se ereção peniana quando o rato levantava-se sobre suas patas posteriores, inclinava-se para frente até alcançar a área genital, manipulava ou lambia seu pênis em ereção total e com ligeiros movimentos pélvicos. Os parâmetros avaliados foram:

- número de animais em que ocorreram ereções
- média de ereções ocorridas em cada grupo
- média de ereções ocorrida somente entre os animais com ereções, em cada grupo
- latência para a primeira ereção peniana

4.6.2. *Teste de Avaliação da Motivação Sexual*

Este teste permite avaliar a preferência do rato entre uma fêmea ativa ou receptiva e uma fêmea não ativa sexualmente.

O experimento foi realizado com ratos machos, experientes sexualmente, com aproximadamente 80 dias de idade. A experiência sexual (EXPS) era dada 1 a 2 dias antes do teste com as fêmeas (FSA), conforme protocolo de comportamento sexual utilizado na rotina do laboratório 11.

Uma semana antes do teste os ratos machos eram habituados com as caixas de observação, porém sem a presença das fêmeas; para tanto eram colocados individualmente para explorá-la, por cinco minutos em 3 dias consecutivos (Agmo, 2003).

Cada macho do experimento, 20 minutos após receber a injeção ICV da droga, era colocado no centro da caixa e era filmado por 20 minutos.

A caixa de observação media 90 x 30 x 30 cm, cujo comprimento era dividido em três partições igualmente espaçadas, por uma parede transparente que continha uma grade no centro. Em cada uma destas partições era colocado um animal, não havendo o contato direto entre os eles, era permitida apenas a comunicação auditiva e olfativa entre os animais através das grades das paredes (Figura 5).

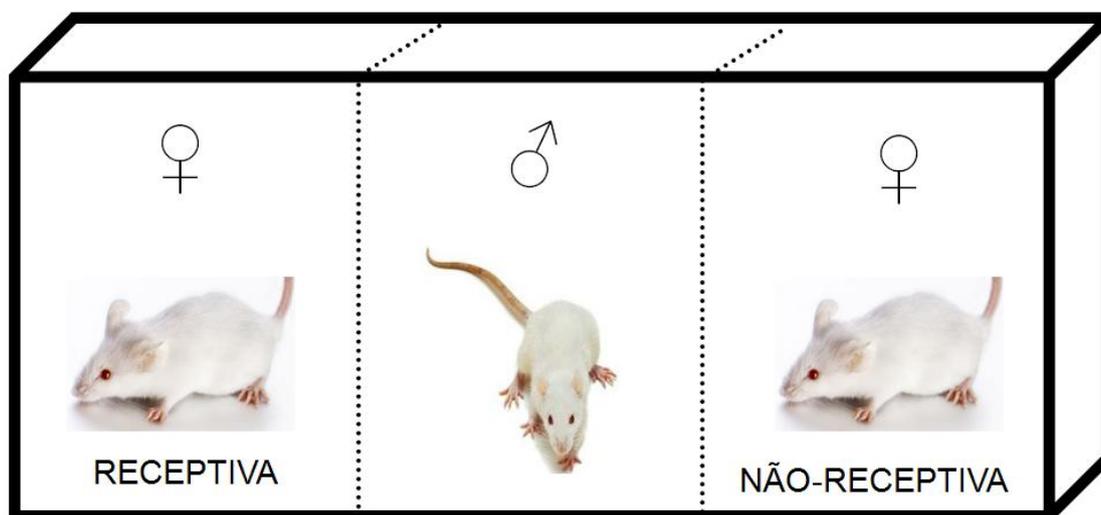


Figura 5 - Desenho esquemático da caixa de Teste de Motivação ou Preferência Sexual

Para o Teste de Motivação Sexual (TMS), as fêmeas, uma FSA e outra FSNA, eram postas individualmente, em cada um dos compartimentos laterais, 20 minutos antes do início das observações dos animais testes, para a familiarização com a caixa (Figuras 5 e 6).

A cada macho testado, tanto a FSA, quanto a FSNA eram substituídas por outra do mesmo grupo, desta forma evitava-se que a fêmea, ao ser utilizada em mais de um teste, perdesse o interesse em explorar a caixa e farejar o animal do compartimento vizinho.



Figura 6 – Fotografia da caixa de teste de motivação ou preferência sexual

Foram avaliados para este teste, por meio do Programa Noldus Observer (Noldus Information Technology, Holanda), a frequência, a latência, o tempo total de duração em milissegundos e a porcentagem total do tempo de duração para cada um dos seguintes parâmetros:

- farejar a grade da fêmea sexualmente ativa (GA)
- farejar a grade da fêmea sexualmente não-ativa (GN)
- farejar a parede do compartimento onde está localizada a fêmea sexualmente ativa, exceto a grade do mesmo compartimento (PA)
- farejar a parede do compartimento da fêmea sexualmente não-ativa, exceto a grade do mesmo compartimento (PN)
- farejar o lado em que está colocada a fêmea sexualmente ativa (LA)
- farejar o lado em que está colocada a fêmea sexualmente não-ativa (LN)
- fazer *grooming* (GR)
- manipular ou lambe a região genital (GE)
- tempo restante, quando o animal executou comportamentos que não foram avaliados (ND).

Ao somar o tempo em que o animal cheira a GA com o tempo em que o animal cheira a PA obtêm-se o tempo total em que ele cheira o lado em que estava colocada a fêmea sexualmente ativa (LA). Da mesma forma, ao somar o tempo em que o animal cheira a PN com o tempo em que ele cheira a GN obtêm-se o tempo total em que ele cheira o lado em que estava a fêmea sexualmente não-ativa (LN).

4.7. Análise Histológica

Considerando que apesar da técnica estereotáxica possibilitar manusear medidas precisas, existem variações anatômicas entre ratos de diferentes pesos e mesmo entre de pesos semelhantes e que, principalmente, pudesse haver erro na execução da técnica cirúrgica (Moreira *et al.*, 2004), foram feitos cortes histológicos do encéfalo dos ratos utilizados no estudo.

No dia seguinte ao dia de teste, cada animal era anestesiado e, então, recebia via ICV 0,5µl de azul de toluidina a 2% (Sarmiento, 2009), a fim de aumentar o contraste das marcas das cânulas e marcar o local onde a droga havia sido infundida originalmente. A seguir, o animal era sacrificado por decapitação e seu encéfalo era rapidamente retirado e estocado em solução de formaldeído a 10%.

Após alguns dias para a fixação, os encéfalos eram analisados para conferir o posicionamento das cânulas. Apenas os animais que apresentaram o posicionamento correto das cânulas foram considerados para a análise estatística (Genro, 2005).

4.8. Delineamento Experimental

4.8.1. Delineamento Experimental: Teste Desempenho Sexual

Esquema do protocolo de experimentos com os machos dos grupos de animais experimentais para o teste de desempenho sexual (detalhes estão descritos acima):

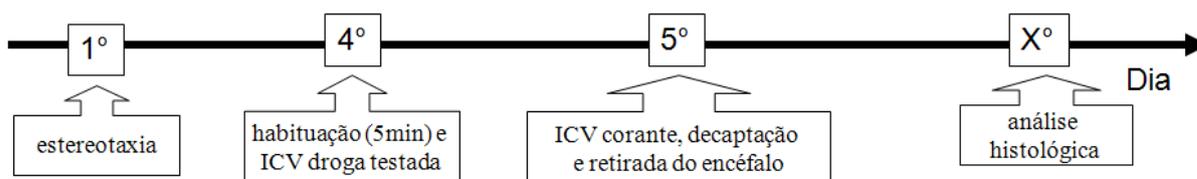


Figura 7 – Esquema Delineamento Experimental Teste de Desempenho Sexual

4.8.2. Delineamento Experimental: Teste de Motivação Sexual

Esquema do protocolo de experimentos com os machos dos grupos de animais experimentais para o teste de motivação sexual (detalhes estão descritos acima):

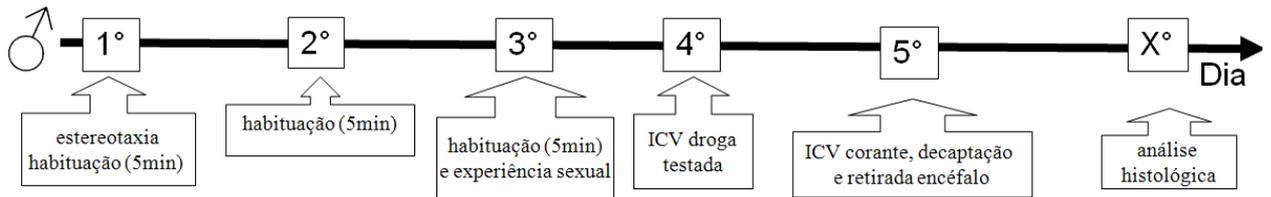


Figura 8 – Esquema delineamento experimental teste de motivação sexual para os machos

Esquema do protocolo de experimentos com as fêmeas dos grupos de animais auxiliares para o teste de motivação sexual dos machos (detalhes estão descritos acima):

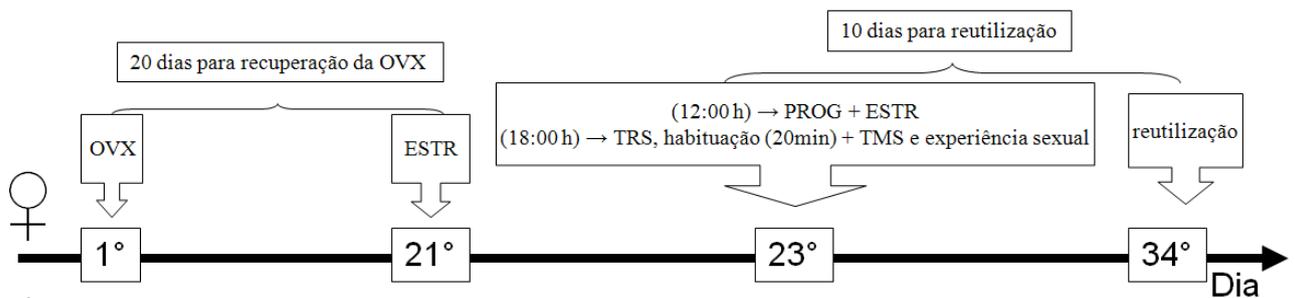


Figura 9 – Esquema delineamento experimental teste de motivação sexual para as fêmeas sexualmente ativas

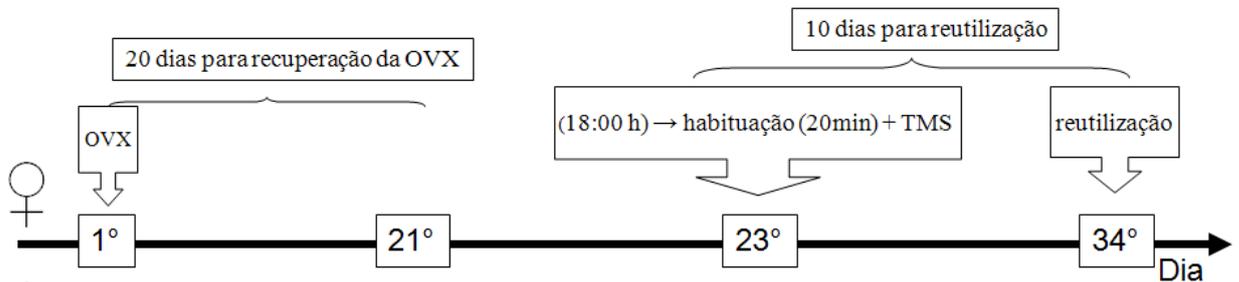


Figura 9 - Esquema delineamento experimental teste de motivação sexual para as fêmeas sexualmente não-ativas

4.9. Critérios de Exclusão da Amostragem

Apenas os animais que puderam ser submetidos a todos as etapas experimentais necessárias sem que houvesse indícios de falha em procedimentos ou comportamentos que pudessem indicar comprometimento da capacidade do animal em desempenhar os comportamentos esperados foram incluídos na amostragem final e análise de resultados. As atividades de caminhar, *rearing* e *grooming* foram observadas e os animais com alterações visíveis no sistema locomotor foram descartados. Além disso, animais que apresentaram sintomas de doença em qualquer das etapas experimentais foram excluídos. Foram também excluídos das análises de resultados, os animais que tiveram sua cânula inutilizável, tanto no momento da injeção das drogas testadas, quanto da injeção do corante para a execução da histologia.

Além disso, em todos os grupos não foram analisados os animais que permaneceram imóveis, sem exploração do ambiente, por mais de 5 minutos seguidos no teste de motivação sexual e mais de 10 minutos seguidos no teste de desempenho sexual.

Este protocolo de exclusão foi utilizado em todos os grupos experimentais. Assim, ao final, para o teste de desempenho sexual a perda foi de 44% dos 75 ratos machos utilizados e para o teste de motivação sexual a perda foi de 67% dos 75 ratos utilizados.

4.10. Análise Estatística

Para determinar a normalidade na distribuição da amostra foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino e Pearson.

O comportamento sexual dos machos no teste da motivação sexual (preferência sexual pela fêmea sexualmente ativa em relação a fêmea sexualmente não-ativa) e no teste do desempenho sexual (latência para a primeira ereção peniana medida em segundos e a frequência de ereções penianas) foi comparado entre os grupos - controle positivo, controle negativo e teste - através do teste ANOVA de uma via, e seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls, quando a distribuição for considerada normal. No caso de distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn.

Para comparar a latência para primeira ereção e número de ereções em animais com ereção foi utilizado o teste *t de Student* não pareado. Na comparação das médias no teste de motivação sexual foi utilizado o teste *t de Student* para amostras pareadas.

Com o objetivo de verificar se a latência para a primeira ereção influenciava no número de ereções correlaciona-se a latência para a primeira ereção com o número de ereções ocorridas em cada animal. Para isso, foi utilizado o coeficiente de Pearson, que permite verificar uma correlação positiva ou negativa bem como a sua ausência. A correlação foi estipulada segundo a tabela abaixo (Tabela 1).

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais. Foram consideradas significativas as diferenças com um *p* menor que 0,05 (nível de significância maior do que 95%).

Coeficiente de Correlação	Correlação
$r = 1$	Perfeita Positiva
$1 > r > 0,8$	Forte Positiva
$0,8 > r > 0,5$	Moderada Positiva
$0,5 > r > 0,1$	Fraca Positiva
$0,1 > r > -0,1$	Nula
$-0,1 > r > -0,5$	Fraca Negativa
$-0,5 > r > -0,8$	Moderada Negativa
$-0,8 > r > -1$	Forte Negativa
$r = -1$	Perfeita Negativa

Tabela 1 - Figura do Coeficiente de Correlação de Pearson

4.11. Reagentes e Destino dos Resíduos da Pesquisa

Todos os reagentes foram manipulados pelo pesquisador com uso de luvas, máscara e avental. Após o término dos testes comportamentais, os animais sacrificados foram inicialmente acondicionados em sacos plástico próprios para descarte, de cor branca (para resíduos biológicos), e colocados no freezer do laboratório (-18° C). As carcaças e os demais resíduos biológicos dos animais foram levados congelados para o Biotério Central da UFRGS, onde o tratamento posterior é padronizado.

5. RESULTADOS

5.1. Teste Desempenho Sexual

No grupo γ -MSH a amostra final “n” foi de 8 animais, no grupo MT-I o “n” foi de 14 animais e no grupo MT-II foram testados 20 animais.

5.1.1. *Ocorrência ou não de ereção peniana*

No teste de desempenho sexual, durante os 60 minutos de observação, a ocorrência de ereção peniana foi verificada em 13 dos 20 animais testados com o MT-II ($65\% \pm 10,9$), em 5 dos 14 animais testados com o MT-I (aproximadamente $35,7\% \pm 13,3$) e em nenhum dos 8 animais testados com o γ -MSH ($0\% \pm 0$). A distribuição da variável ereção nos grupos não segue a normalidade. O resultado da variação da média foi considerado estatisticamente diferente entre os grupos ($p < 0,01$). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn.

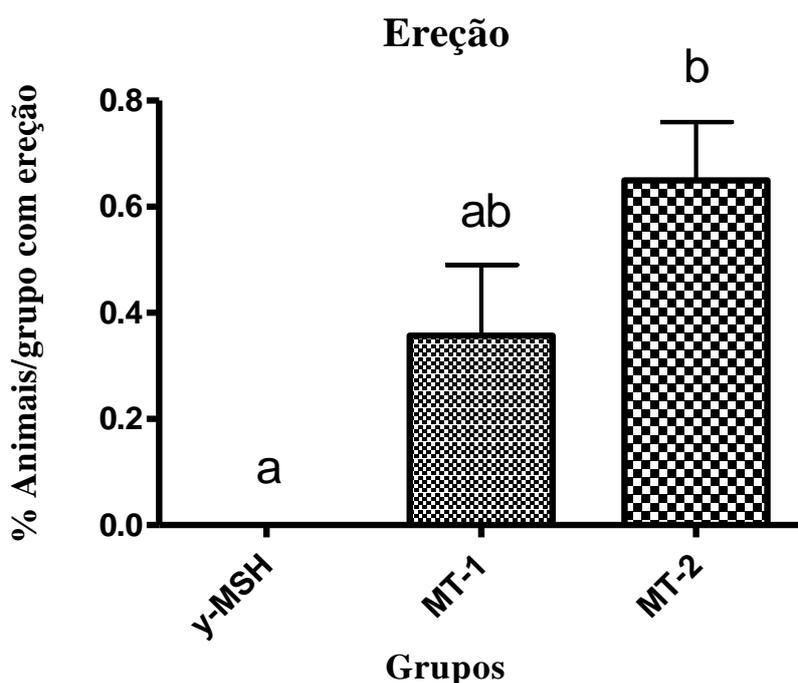


Figura 11 - Porcentagem (média ± EPM) de animais com ereção em cada grupo. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn.

5.1.2. Soma do número de ereções em cada grupo

A soma do número de ereções penianas, ocorridas durante os 3600 segundos de cada experimento, foi 0 para o grupo γ -MSH ; 23 para o grupo MT-I e 104 para o grupo MT-II. Porém, como o n amostral final variou bastante entre os grupos, estes valores não podem ser comparados simplesmente. Para tal, foi necessário calcular a média de ereções em cada um dos grupos em relação ao número de animais e então fazer a análise da variação entre eles.

5.1.3. Média do número de ereções em cada grupo

Ao calcular a média de ereções em cada um dos grupos observa-se que: no grupo γ -MSH a mesma é 0 ± 0 , pois nenhum dos 8 animais testados apresentou ereções; no grupo MT-I é $1,6 \pm 0,6$, pois 5 animais dos 14 testados neste grupo apresentaram ereções; e no grupo MT-II é $5,2 \pm 1,1$, pois 13 animais dos 20 testados neste grupo

apresentaram ereções. A variação da média foi diferente entre os grupos e sua distribuição segue a normalidade. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. O grupo MT-II diferiu para esta variável do grupo γ -MSH e do grupo MT-I, porém não houve diferença entre os grupos γ -MSH e MT-I (Figura 12).

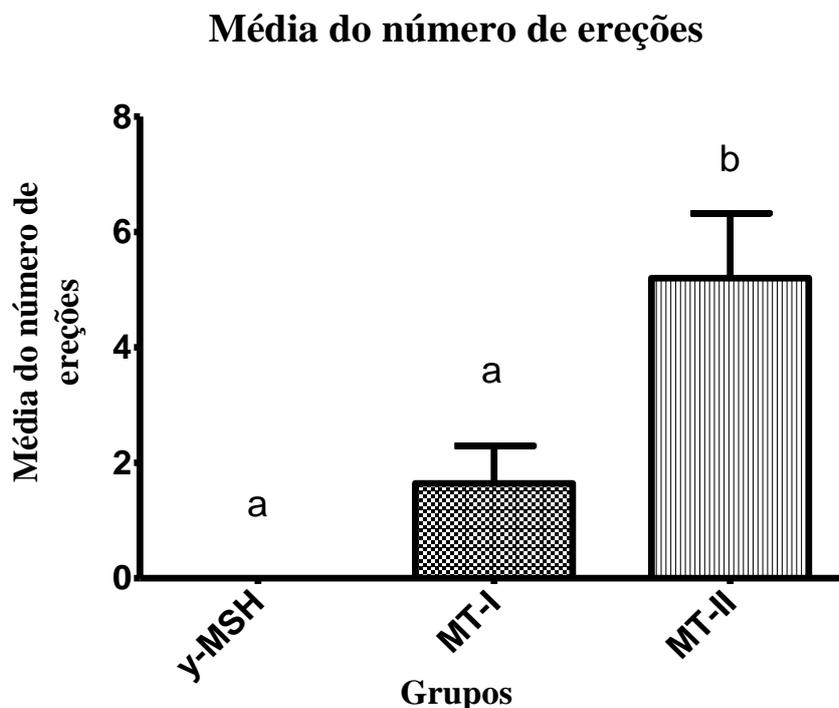


Figura 12 – Média \pm EPM de ereções ocorridas em cada grupo. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn.

5.1.4. Média de ereções por grupo entre os animais com ereção

A média de ereções nos animais que apresentaram ereções no Grupo MT-I foi $4,6 \pm 0,7$ ($n = 5$) e no grupo MT-II foi $8,0 \pm 1,1$ ($n = 13$), porém a diferença entre eles não atingiu a significância estabelecida ($p = 0,08$). A distribuição da média de ereções por grupo entre os animais que apresentaram ereções durante o período avaliado segue a normalidade. Os dados foram analisados por um teste *t* de Student não-pareado.

5.1.5. Latência para a primeira ereção

A média da latência para primeira ereção no grupo γ -MSH foi 3600 segundos, já que nenhum dos animais apresentou ereção durante o tempo avaliado, a do grupo MT-I foi $2867 \pm 276,6$ segundos e a do grupo MT-II foi $2058 \pm 279,6$ segundos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. A distribuição da variável latência não segue a normalidade. A variação das médias é significativamente diferente ($p < 0,01$). O grupo MT-II foi diferente do grupo γ -MSH, sendo que o grupo MT-I não foi diferente dos demais grupos (Figura 13).

Média da latência para a primeira ereção

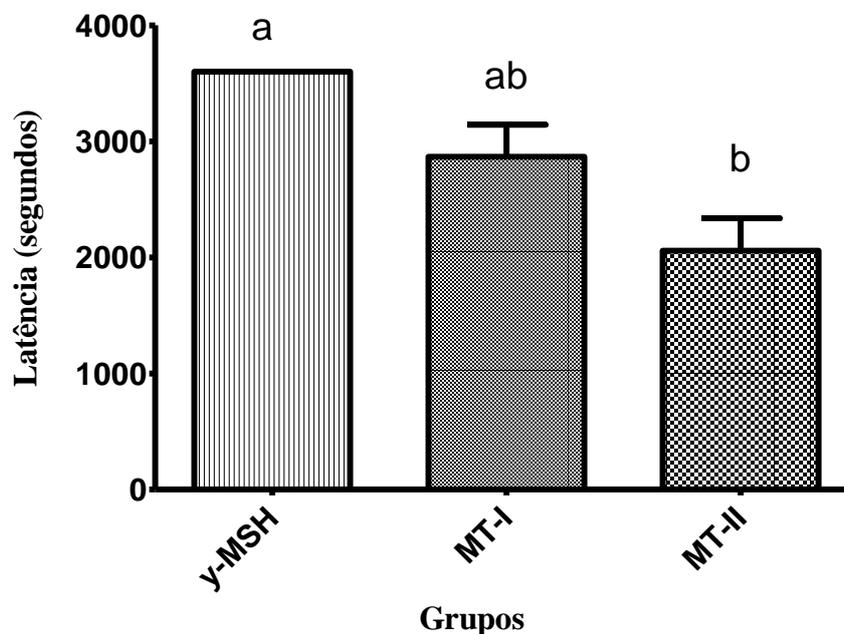


Figura 13 – Média \pm EPM da latência para ocorrência da primeira ereção em segundos e em cada grupo. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn.

5.1.6. Latência para a primeira ereção em animais com ereção

A média das latências, somente dos animais que apresentaram ereção, não variou entre os grupos MT-I ($1548,0 \pm 139,3$ segundos; $n=5$) e MT-II ($1181,0 \pm 177,6$

segundos; n=13). Essas médias foram comparadas através do teste *t* de Student não pareado e as diferenças não atingiram nível de significância estabelecido.

5.1.7. Correlação entre a latência e o número de ereções

Ao avaliar os 5 animais que tiveram ereções no grupo MT-I observa-se que não há correlação entre a latência e o número de ereções ($r=-0,001$; $p=0,99$), porém nos 13 animais do grupo MT-II observa-se que a latência se correlaciona com o número de ereções de uma forma moderada negativa ($r=-0,56$; $p=0,047$) (Figuras 14 e 15).

Dispersão dos dados de latência para primeira ereção x número total de ereções em MT-I

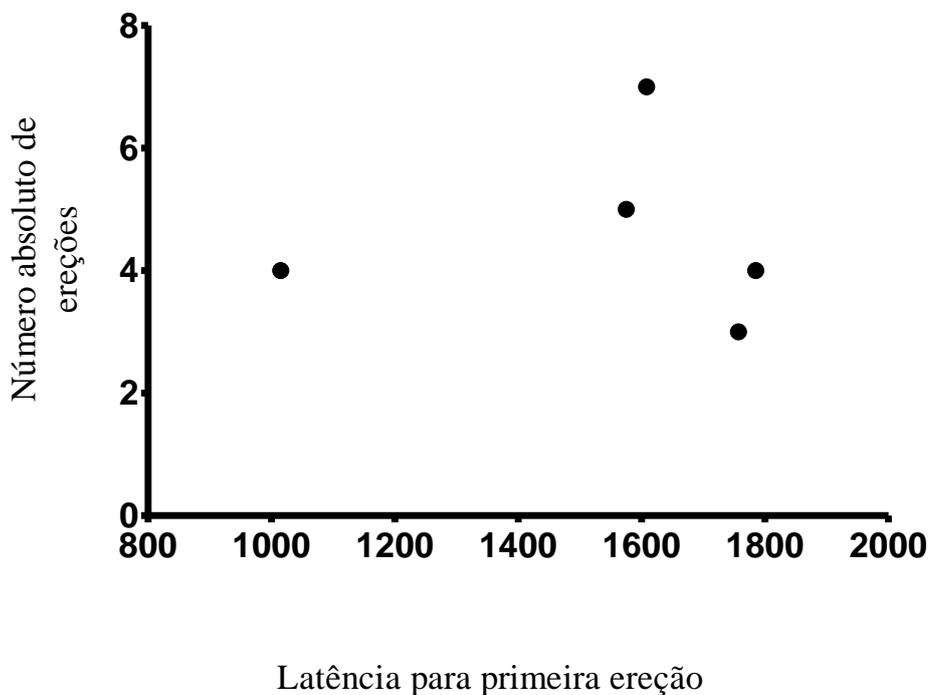


Figura 14 – Dispersão dos dados de latência (segundos) para a primeira ereção X número total de ereções no grupo MT-I (n=5). Neste gráfico, observa-se que não há correlação entre a latência e o número de ereções ($r=-0,001$; $p=0,99$).

Dispersão dos dados de latência para primeira ereção x número total de ereções em MT-II

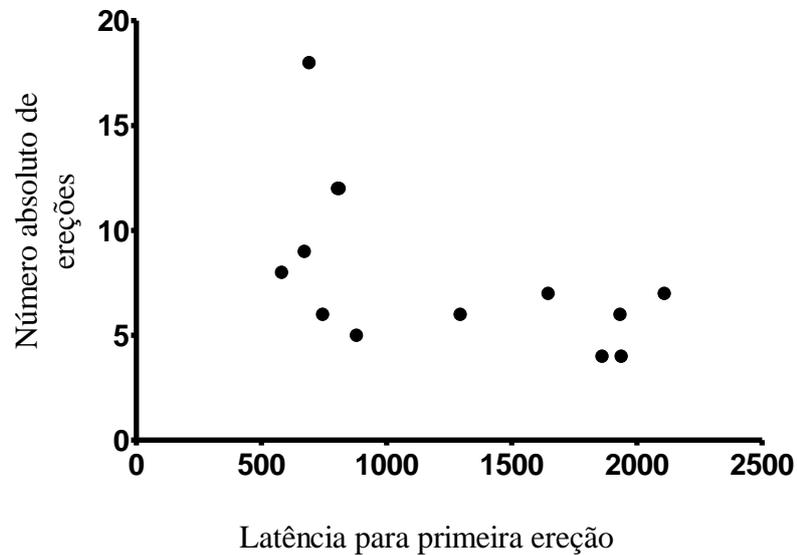


Figura 15 – Dispersão dos dados de Latência (segundos) para a Primeira Ereção X Número total de Ereções no grupo MT-II (n=13). Neste gráfico, observa-se que a latência se correlaciona com o número de ereções de uma forma moderada negativa ($r=-0,56$; $p=0,04$).

5.2. Teste de Motivação Sexual

5.2.1. Amostra do Teste Motivação Sexual

No grupo γ -MSH a amostra final “n” foi de apenas 7 animais, no grupo MT-I o “n” foi de 9 animais e no grupo MT-II também de 9 animais.

Grupo	γ -MSH	MT-I	MT-II
GA	52,9 ± 13,4	73,1 ± 22,9	42,3 ± 7,0
GN	32,7 ± 11,6	38,1 ± 12,0	14,3 ± 2,1
PA	111,0 ± 23,2	60,5 ± 6,9	81,3 ± 12,1
PN	64,5 ± 13,5	62,7 ± 13,4	60,5 ± 7,3
LA	163,9 ± 27,6	133,6 ± 28,0	123,6 ± 14,4
LN	97,2 ± 14,9	100,8 ± 24,6	74,81 ± 7,4
GE	10,8 ± 3,9	9,9 ± 4,1	47,3 ± 14,0
GR	211,5 ± 30,3	217,6 ± 40,3	156,7 ± 33,9
ND	719,1 ± 24,4	690,2 ± 44,8	794,1 ± 45,9

Tabela 2– Média ± EPM do tempo em segundos para cada um dos grupos do teste de motivação sexual em ratos machos. GA = grade da caixa em que estava a fêmea sexualmente ativa; GN = grade da caixa em que estava a fêmea sexualmente não-ativa; PA = parede da caixa em que estava a fêmea sexualmente ativa, exceto a região da grade do mesmo compartimento; PN = parede da caixa em que estava a fêmea sexualmente não-ativa, exceto a região da grade do mesmo compartimento; LA = lado da caixa em que estava a fêmea sexualmente ativa; LN = lado da caixa em que estava a fêmea sexualmente não-ativa; GE = manipular ou lambe a região genital; GR = *grooming*; ND = tempo restante (comportamentos não avaliados).

5.2.2. *Motivação Sexual na Região das Grades*

Frequência que o macho cheira a grade em que estava a fêmea sexualmente ativa (GA)

A comparação, entre os grupos, da frequência em cheirar a grade da fêmea sexualmente ativa não atingiu diferença estatisticamente significativa entre eles (γ -MSH = 25,6 ± 5,9; MT-I = 20,5 ± 2,8; e MT-II = 17,2 ± 2,4). A distribuição dos dados não segue a normalidade. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tempo em que o macho cheira a grade em que estava a fêmea sexualmente ativa (GA)

Ao comparar as médias de tempo que o macho cheira a grade da fêmea sexualmente ativa (GA), observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos (tabela 2). A distribuição dos dados não segue a normalidade. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Comparação entre cheirar grade em que estava a fêmea sexualmente ativa (GA) x cheirar grade em que estava a fêmea sexualmente não-ativa (GN)

Comparando, em cada grupo, o tempo que o animal despense cheirando a GA com o tempo de cheirar a GN, a diferença entre os animais do grupo MT-I não foi estatisticamente significativa (não houve preferência pela grade da fêmea sexualmente ativa), porém no grupo MT-II ($p = 0,002$) e no grupo γ -MSH ($p = 0,04$) foi significativa (Figura 16). Os dados foram analisados pelo teste *t de Student* para amostras pareadas (Figura 16).

Comparação da média do tempo que os animais cheiram a GA à média que cheiram a GN em de cada grupo

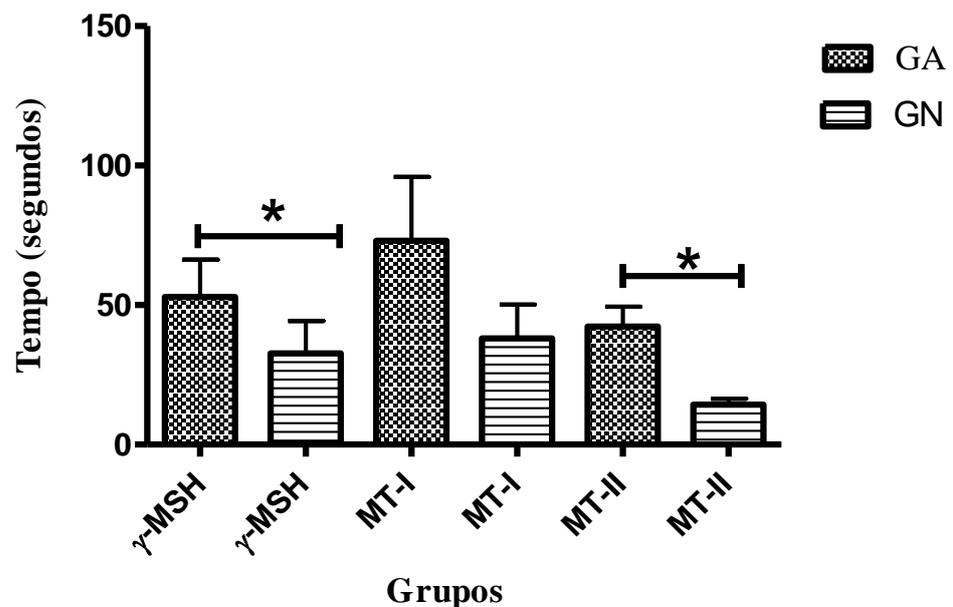


Figura 16 – Comparação da média do tempo \pm EPM, em cada grupo, em que os

animais cheiravam a grade da fêmea ativa (GA) com o tempo em que cheiram a grade da fêmea sexualmente não-ativa (GN). Os dados foram analisados pelo teste *t de Student* para amostras pareadas. O asterisco (*) no gráfico indica que houve diferença estatística entre a média do tempo em que os animais cheiravam a grade da fêmea sexualmente ativa e a média do tempo em que cheiravam a grade da fêmea sexualmente não-ativa. Os animais do grupo MT-I não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre essas médias de tempo.

5.2.3. *Motivação sexual na região das paredes*

Frequência que o macho cheira a parede da caixa em que está a fêmea sexualmente ativa PA

A frequência de visitas à parede em que foi colocada a fêmea sexualmente ativa (PA) foi maior nos animais injetados com o γ -MSH ($42,6 \pm 5,6$) que nos animais injetados com o MT-I ($30,8 \pm 3,4$) e MT-II ($31,6 \pm 4,2$), porém a diferença entre eles também não foi estatisticamente significativa. O teste utilizado foi o de Kruskal-Wallis e a distribuição dos dados não segue a normalidade.

Tempo em que o macho cheira a parede da caixa em que está a fêmea sexualmente ativa PA

Ao comparar as médias de tempo que o macho cheira a parede da fêmea sexualmente ativa (PA), observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos (tabela 2). A distribuição dos dados não segue a normalidade. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,07$).

Comparação entre cheirar PA x cheirar PN

Ao comparar, em cada grupo, o tempo que o animal despende cheirando a PA com o tempo PN, a diferença no grupo γ -MSH ($p=0,07$) e no grupo MT-I não foi estatisticamente significativa entre os animais, porém no grupo MT-II foi significativa ($p = 0,02$). Foi utilizado para estes cálculos o teste *t de Student* para amostras pareadas.

5.2.4. Motivação sexual entre os lados

Tempo em cheirar o lado da caixa em que está a fêmea sexualmente ativa (LA)

Ao comparar as médias de tempo que o macho cheira o lado da caixa da fêmea sexualmente ativa (LA), observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos (tabela 2). A distribuição dos dados segue a normalidade. Foi utilizado para estes cálculos o teste ANOVA de uma via ($F_{(2,22)} = 0,72$).

Comparação entre cheirar LA x cheirar LN

Ao comparar dentro de cada grupo o tempo que o animal permanece cheirando a LA ao tempo LN (Tabela 2) a diferença no grupo MT-I não foi estatisticamente significativa entre os animais, porém no grupo γ -MSH ($p = 0,02$) e no MT-II ($p = 0,002$) foi significativa (Figura 17). Estes valores foram comparados utilizando-se o teste *t de Student* para amostras pareadas.

Comparação da média do tempo que os animais cheiram a LA à média que cheiram a LN em cada grupo

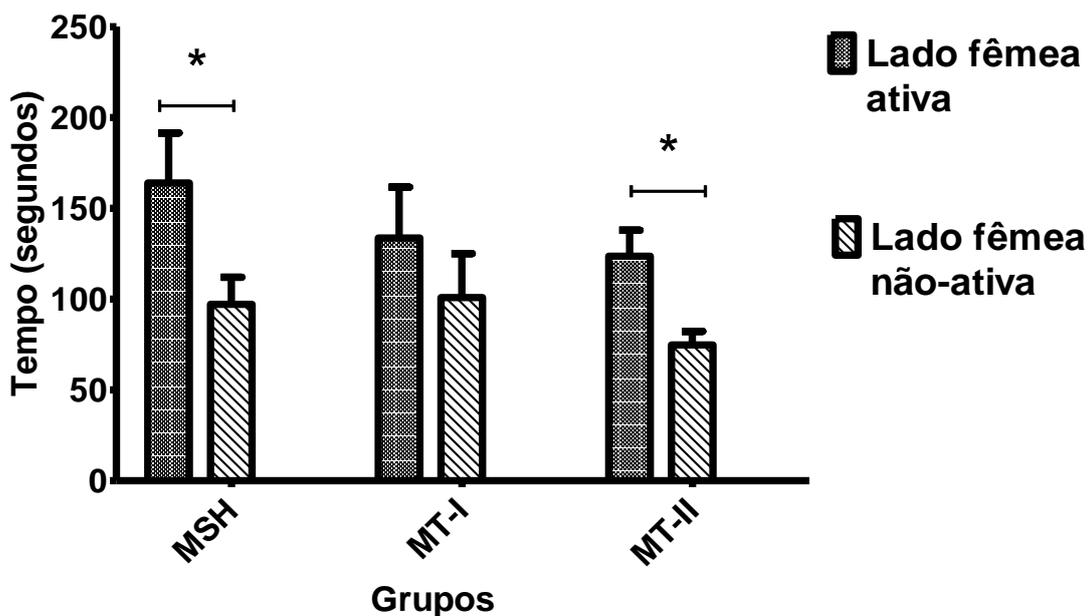


Figura 17 – Comparação da média \pm EPM do tempo (segundos), em cada grupo, em que os animais permanecem cheirando o lado da fêmea ativa ao tempo em que cheiram o lado da fêmea não ativa. Os 7 animais do grupo γ -MSH permaneceram, em média, $163,9 \pm 27,6$ segundos cheirando o LA e $97,2 \pm 14,9$ segundos cheirando o LN; esta diferença estatisticamente foi significativa ($p = 0,02$). A diferença entre a média de tempo que os 9 animais cheiravam o LA no grupo MT-II ($123,6 \pm 14,4$ segundos) e cheiravam o LN ($74,8 \pm 7,4$) também foi significativa ($p = 0,002$). Os 9 animais do grupo MT-I permaneceram, em média, $133,6 \pm 28,02$ segundos cheirando LA e $100,8 \pm 24,7$ segundos cheirando LN; esta diferença não foi estatisticamente significativa. O asterisco (*) no gráfico indica que houve diferença estatística entre a média do tempo em que os animais cheiravam o lado da fêmea sexualmente ativa e a média do tempo em que cheiravam o lado da fêmea sexualmente não-ativa. Estes valores foram comparados utilizando-se o teste *t de Student* para amostras pareadas.

5.2.5. *Manipular ou lambe a região genital (GE)*

Frequência de manipulação ou lambedura da região genital GE

A média da frequência em que os ratos machos estudados praticaram o GE variou entre os grupos estudados ($p = 0,02$). O Grupo MT-I ($1,3 \pm 0,6$) foi diferente do MT-II ($3,8 \pm 0,6$), porém o grupo γ -MSH ($1,9 \pm 0,5$) não foi significativamente diferente dos demais grupos (Figura 18). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por um teste *post hoc* de Dunn.

Frequência GE

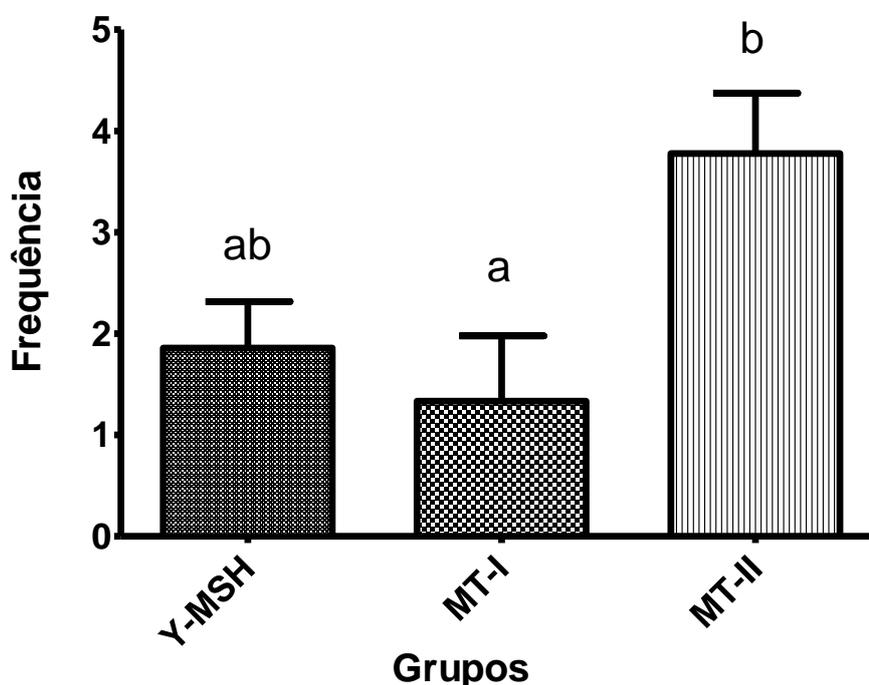


Figura 18 – Média \pm EPM da frequência de manipulações e/ou lambidas na região genital (GE). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos e pelo menos uma letra em comum representa não haver diferença significativa entre os grupos. A distribuição dos dados segue a normalidade, os mesmos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por um teste *post hoc* de Dunn

Tempo de manipulação ou labedura da região genital (GE)

Da mesma forma que ocorreu diferença quanto à frequência de GE, o tempo GE também diferiu entre os grupos ($p = 0,01$). A distribuição dos dados seguiu a normalidade, os mesmos foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via ($F_{(2,22)} = 5,4$) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. O tempo de GE no grupo MT-II ($47,7 \pm 14$ segundos) diferiu do tempo de GE no grupo MT-I ($9,9 \pm 4,1$ segundos) e do tempo de GE no grupo γ -MSH ($10,8 \pm 3,9$ segundos), porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos MT-I e γ -MSH (Figura 19).

Tempo GE

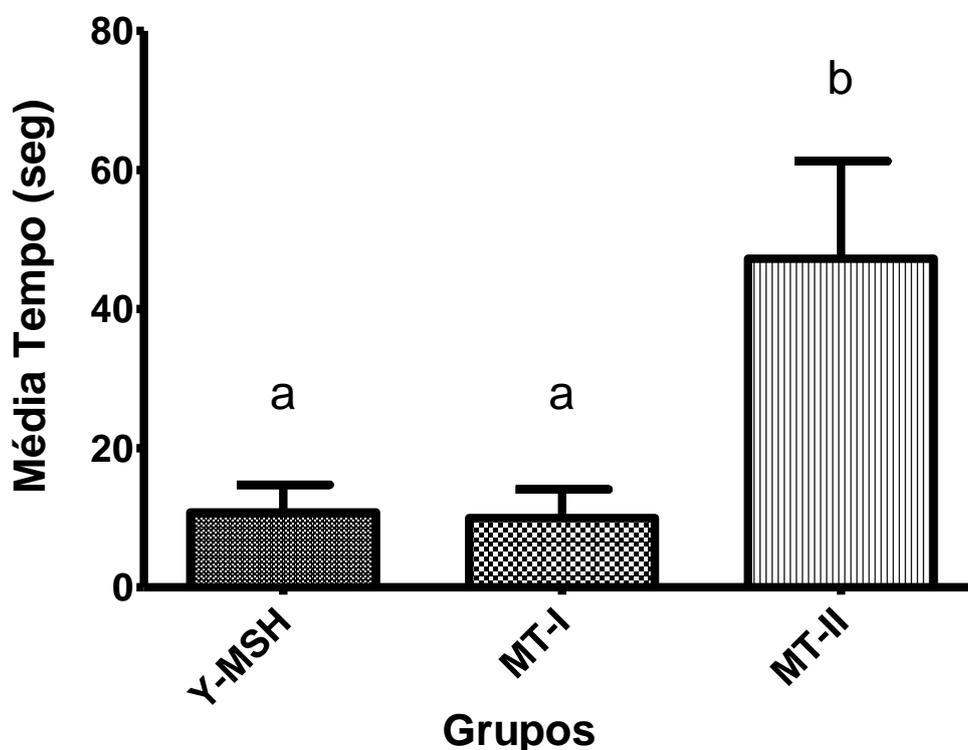


Figura 19 – Média \pm EPM do tempo de manipulações e/ou lambidas na região genital (GE). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. A distribuição dos dados seguiu a normalidade, os mesmos foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via ($F_{(2,22)} = 5,4$) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Latência manipulação ou lambedura da região genital GE

As médias das latências para a ocorrência de manipulações ou lambidas na região genital variou entre os grupos ($p = 0,04$) (Figura 20).

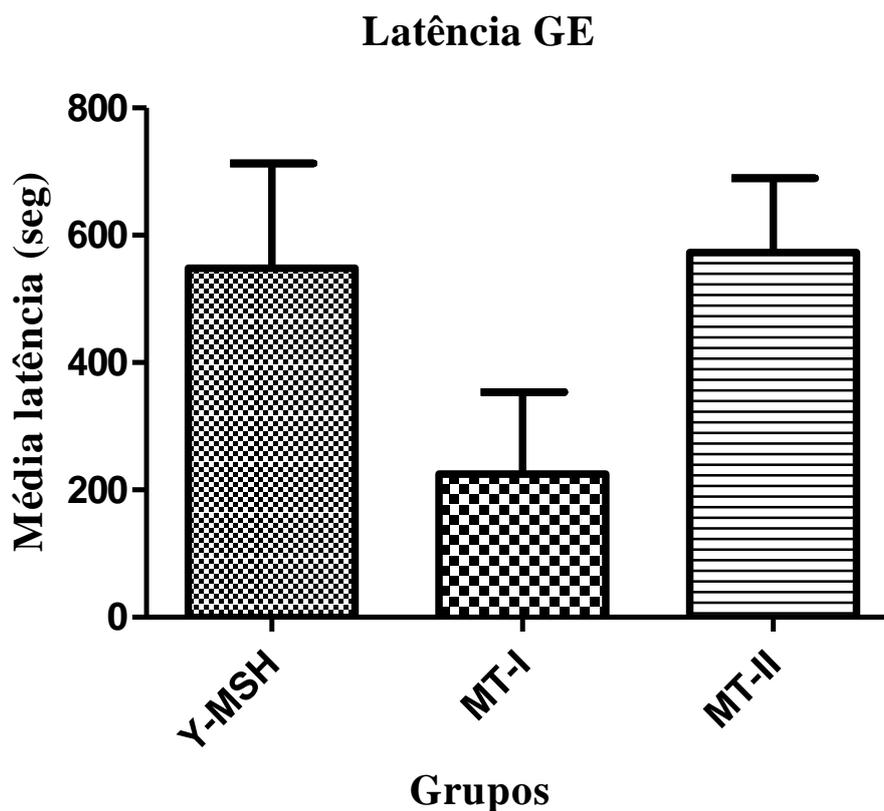


Figura 20 – Média da latência para ocorrência de GE variou entre os grupos ($p = 0,04$). Porém os grupos γ -MSH (548,5 ± 164,2 segundos); grupo MT-I (224,7 ± 128,6 segundos); e grupo MT-II (573,2 ± 116,1 segundos) não diferiram de forma estatisticamente significativa entre eles. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por um teste *post hoc* de Dunn.

5.2.6. Prática de grooming (GR)

A prática de GR não foi estatisticamente diferente entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: frequência GR ($p = 0,51$; teste: ANOVA de uma via [$F_{(2,22)} = 0,7$]), tempo GR ($p = 0,42$; teste: ANOVA de uma via) e latência GR ($p = 0,6$; teste: Kruskal-Wallis).

5.2.7. *Período em que os animais estudados não executaram nenhum dos comportamentos avaliados no teste (ND)*

Tempo ND

Os 3 grupos, em média, permaneceram o mesmo tempo do teste sem executar nenhum dos comportamentos avaliados (tempo ND). Portanto, a diferença entre eles não foi estatisticamente significativa. Foi utilizado para estes cálculos o teste ANOVA de uma via ($F_{(2,22)} = 1,75$).

Frequência ND

A frequência de ND também não variou de forma estatisticamente significativa entre os grupos. A sua distribuição dos dados segue a normalidade e os mesmos foram analisados pelo teste ANOVA de uma via ($F_{(2,22)} = 2,27$).

6. DISCUSSÃO

Na população de animais estudada, o melanotan I, injetado ICV (1 µg / animal), produziu a ereção peniana em uma proporção inferior de machos sexualmente inexperientes (36% dos ratos) do que o melanotan II (1 µg / animal ICV) (65% dos ratos) e do que o controle γ -MSH (1 µg / animal ICV) (0%). A diferença entre essas proporções foi significativa entre os grupos MT-II e γ -MSH. No grupo injetado com γ -MSH (controle negativo) nenhum rato apresentou ereção, como esperado, visto que esse agonista endógeno do sistema de melanocortinas não atua sobre o comportamento sexual (Grieco *et al.*, 2000). Do mesmo modo, os resultados mostram que a média do número de ereções ocorridas durante o período de registro (60 minutos) após a injeção do MT-I foi menor do que após a injeção do MT-II. Além disso, confirmando que os animais injetados ICV com peptídeo MT-I têm um desempenho sexual menor do que aqueles injetados com o MT-II, a latência para primeira ereção foi maior do que no grupo controle positivo. Logo, o MT-I causou ereções em aproximadamente 30% a menos de animais que o MT-II e, da mesma forma, demorou em média 39% a mais de tempo para causar a primeira ereção.

Sendo assim, os resultados mostram que o peptídeo objeto deste estudo (MT-I) induz à ereção peniana em ratos machos sexualmente inexperientes, mas com uma capacidade menor do que o análogo MT-II. Os resultados não confirmam totalmente

nossa hipótese inicial, qual seja o peptídeo estudado não deveria atuar sobre o sistema neural envolvido com a ereção peniana. Nós esperávamos que não houvesse ereção nos animais injetados ICV com o MT-I. No entanto, o MT-I induziu menos ereção do que o seu análogo MT-II na mesma dose e via de administração. Por outro lado, o presente trabalho contribui para o estudo dos efeitos de derivados da melanocortina no sistema nervoso, mostrando de forma original os efeitos do MT-I na função sexual.

Trabalhos prévios em ratos machos mostraram que o ACTH foi capaz de produzir uma diminuição na latência ejaculatória, porém não alterou a frequência e a incidência de monta nas fêmeas (Bertolini *et al.*, 1975; Spruijt *et al.*, 1985), comprovando que componentes do padrão de comportamento sexual podem responder de forma diferenciada. Em nosso estudo, o MT-I provocou um pior desempenho sexual quanto à capacidade de provocar ereções espontâneas em relação ao MT-II. De fato, o MT-I reduziu em relação ao MT-II todas as variáveis analisadas da ereção, como ocorrência ou não de ereção; média de ereções por animal; média de ereções por grupo; latência para primeira ereção no grupo, incluindo mesmo os que não tiveram ereção; latência para a primeira ereção nos animais que tiveram ereção; e na correlação feita entre a ocorrência e a latência de ereção. O escore das variáveis da ereção dos ratos injetados ICV com MT-I é intermediário aos valores dos ratos que receberam MT-II (controle positivo) e o γ -MSH (controle negativo).

Os efeitos do MT-II sobre a função sexual de homens e mulheres têm sido amplamente estudados, sendo que a droga parece aumentar o fluxo sanguíneo para a genitália (Gura, 2003). Sabe-se que o Melanotan II é capaz de iniciar ereções em ratos, cachorros e seres humanos com disfunção erétil psicogênica ou orgânica (em 69% das administrações nos homens (Wessells *et al.*, 2000; Wessells *et al.*, 1998; Dorr *et al.*, 1996). Um modelo animal, em rato, já havia concluído que as vias centrais e periféricas de melanocortina recrutadas pelo MT-II dependem da via de administração do peptídeo e que o mesmo era capaz de causar a ereção peniana em ratos quando administrado por via ICV, mas também pelas vias intratecal e intravenosa em uma forma dose-dependente (Wessells *et al.*, 2003). Conhecia-se, por exemplo, a capacidade do MT-II de exercer uma atividade erétil dependente da dose e da via de administração, quando injetado intravenosamente (0,1, 0,3 e 1mg/kg) ou no núcleo paraventricular do hipotálamo (0,1 e 1 μ g), inclusive reduzindo a latência para a ocorrência da primeira

ereção (Giuliano *et al.*, 2006). No presente estudo, ao ser usado como controle positivo, o MT-II apresentou resultado semelhante ao já encontrado na literatura. O tempo médio de ocorrência da primeira ereção, entre todos os animais do grupo MT-II, foi de $34,3 \pm 4,7$ minutos. Wessel *et al.* (2003) relatam $32,4 \pm 4,1$ minutos como média de latência da primeira ereção após a injeção ICV de MT-II.

A concordância dos resultados obtidos com os da literatura nos permite concluir que os procedimentos experimentais utilizados foram adequados, inclusive replicando resultados com outra variedade de ratos (Long-Evans no artigo da literatura acima relatado e Wistar no presente trabalho). Embora o diluente utilizado neste trabalho tenha sido água destilada, conforme instruções do pesquisador que produziu os fragmentos do peptídeo, e não um veículo de composição semelhante ao líquido cefalorraquidiano, os resultados concordam com os da literatura. Além disso, o aumento do comportamento sexual do MT-I e MT-II parece não ter sido devido a um efeito inespecífico do diluente, visto que o controle negativo (MSH- γ) não apresenta alterações do comportamento sexual significativas que pudessem ser explicadas por uma ação do veículo.

Em nossos experimentos, era esperado que animais que precocemente apresentassem a primeira ereção tivessem maior número de ereções dentro do período observado. Esta correlação ocorreu de forma negativa moderada no grupo MT-II. Porém, no grupo MT-I a latência não se correlacionou de forma significativa com o número de ereções ocorridas em cada animal.

Não se sabe, até o momento, a forma com que o MT-I atua sobre os seus receptores para promover a ereção peniana. De qualquer maneira, sabe-se que para ativar de forma mais efetiva a atividade erétil, a excitação conjunta dos 2 receptores é necessária (Avis, 2000). A hibridação *in situ* demonstra a presença de dois tipos de receptores de melanocortina no cérebro MCR3 e MCR4. A expressão de MCR3 mRNA é restrita a regiões do hipotálamo e sistema límbico, enquanto MCR4 mRNA foi encontrado virtualmente em cada região do cérebro, incluindo o córtex, tálamo, hipotálamo e tronco cerebral e medula espinhal (Roselli-Rehffuss *et al.*, 1993; Mountjoy *et al.*, 1994). Utilizando o HS104, antagonista seletivo do receptor MCR4, sugeriu-se que os comportamentos: “grooming”, “stretching” e “yawning” induzidos por ACTH e α -MSH são mediados pelo receptor MCR4, ao passo que a ereção peniana não (Vergoni *et al.*, 1998). A capacidade do ACTH e α -MSH em causar “excitação sexual” tem sido

estabelecida em vários estudos utilizando diferentes espécies, incluindo macacos, coelhos, e ratos (Julien, 2001). As injeções intracerebroventriculares de ACTH e α -MSH em doses variando entre 1 a 10 μ g induzem a ereção peniana e bocejo em ratos machos. Aparentemente, os receptores MCR3 são os mediadores do efeito pró-erétil do α -MSH no SNC (Avis, 2000).

O fato de o melanotan II ser capaz de induzir ereções espontâneas quando injetado ICV motivou, neste trabalho, investigar de forma inédita se o mesmo e seu análogo MT-I seriam capazes de interferir no comportamento de preferência sexual. O presente trabalho analisou os efeitos da injeção ICV deste peptídeo em ratos machos sexualmente ativos. A preferência sexual por parceiro é um paradigma que tem sido utilizado para avaliar aspectos motivacionais do comportamento sexual tanto em machos quanto em fêmeas de diversas espécies, inclusive em roedores (Avitsur e Yirmiya, 1999).

Os resultados mostraram que tanto, os machos injetados com γ -MSH como os injetados com MT-II permanecem significativamente mais tempo no lado da fêmea sexualmente ativa em relação ao lado da fêmea não receptiva, bem como preferiram a grade da fêmea sexualmente ativa em relação à da fêmea não ativa. Estes achados, concordam com anteriores, pois na literatura, os resultados obtidos já revelavam uma motivação sexual natural de ratos machos pela fêmea receptiva sexualmente (de Azevedo *et al.*, 2010).

Entretanto, neste estudo o MT-I aboliu a preferência do macho pela fêmea sexualmente receptiva em todos os parâmetros analisados (lado, parede e grade). Além disso, os machos injetados com MT-I apresentam uma duração menor de manipulação genital do que aqueles que receberam o análogo MT-II. Esses resultados indicam que o MT-I reduz a motivação sexual do macho pela fêmea receptiva, quando administrado ICV.

O comportamento de “grooming” não foi diferente entre os grupos, embora fosse esperado que estes análogos das melanocortinas pudessem alterar tal comportamento, pois já foi demonstrada a capacidade do ACTH e peptídeos relacionados em provocar o “grooming” (Gispen *et al.*, 1976).

7. CONCLUSÕES

Este estudo mostra que o melanotan I causa ereções penianas em alguns animais testados, mas em menor proporção do que o análogo MT-II. O MT-I reduziu a preferência sexual de ratos machos, efeito não observado com o MT-II nem com o γ -MSH. Os experimentos contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos de atuação do MT no comportamento sexual quando administrado intracerebroventricularmente em ratos machos, pois ainda existem poucos estudos sobre o tema, e menos ainda, nestes animais.

O conjunto dos resultados deste trabalho permite concluir que o MT-I atua sobre o circuito neural do comportamento sexual de ratos machos, no entanto de forma menos efetiva que o MT-II com relação à performance sexual (ereção). Com relação à preferência pela fêmea sexualmente ativa, o MT-I injetado ICV surpreendentemente afetou negativamente a motivação sexual, nem o MT-II nem o γ -MSH afetaram esse comportamento.

8. PERSPECTIVAS

Pretendia-se com esta dissertação de mestrado contribuir com os estudos dos peptídeos derivados de melanocortinas do grupo da Bowman School of Medicine, Carolina do Norte, o qual nos forneceu os fragmentos de peptídeos.

Os resultados aqui expostos serão analisados em conjunto com a Bowman School e, a partir de então, poderão ser planejados novos estudos em colaboração com o grupo norte-americano. Novos peptídeos derivados da melanocortina devem ser sintetizados e testados para melhor compreensão dos mecanismos de atuação desse sistema sobre o comportamento sexual.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGMO, A. *Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*rattus norvegicus*)*. Journal of Comparative Psychopharmacology, 117(1): 3-14, 2003.

ARISAWA, E. A. L.; CARVALHO, Y. R.; ALMEIDA, J. *The role of calcitonin in bone repair of ovariectomized rats*. Revista da Pós-Graduação, Faculdade de Odontologia, São José dos Campos, Brasil 3(1), 2000.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M. R.; MURGIA, S.; SCHIOTH, H. B. *ACTH-and alpha-MSH induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors*. Brain Research Bulletin, 51:425–431, 2000.

AVIS, N. E. *Sexual function and aging in men and women: community and population-based studies*. Journal Gender Specific Medicine, 3:37–41; 2000.

BERTOLINI, A.; BARALDI, M. *Anabolic steroids: permissive agents of ACTH-induced penile erection in rats*. Life Science, 17:306-310, 1975.

BRANSON, R.; POTOCZNA, N.; KRAL, J. G.; LENTES, K. U.; HOEHE, M. R. HORBER, F. F. *Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations*. New England Journal of Medicine, 348: 1096–1103, 2003.

CATANIA, A.; AIRAGHI, L.; COLOMBO, G.; LIPTON, J. M. *Alphamelanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. Trends in Endocrinology & Metabolism, 11:304-8, 2000.*

CHEN, M.; CAI, M.; MCPHERSON, D.; HRUBY, V.; HARMON, C. M.; YANG, Y. *Contribution of the transmembrane domain 6 of melanocortin-4 receptor to peptide [Pro5, DNaI (2')8]- α -MSH selectivity. Biochemical Pharmacology, 1, 77(1):114–124, 2009.*

CONE, R. D. *The central melanocortin system and energy homeostasis. Trends in Endocrinology & Metabolism, 10:211-6, 1999.*

CONE, R. D. *Studies on the physiological functions of the melanocortin system. Endocrinology Review, 27:736–49, 2006.*

COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CÉRDAN, M. G.; DIANO, S.; HORVATH, T. L. *et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature, 411:480-4, 2001.*

EBERLE, N. A. *The melanotropins. Chemistry, physiology and mechanisms of action. S. Karger publishers, New York, 1988.*

FAN, W.; BOSTON, B. A.; KESTERSON, R. A.; HRUBY, V. J.; CONE, R. D. *Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature, 385:165–168, 1997.*

FAROOQI, I. S.; KEOGH, J. M.; YEO, G. S. M.; LANK, E. J.; CHEETHAM, T. AND O'RAHILLY, S. *Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. New England Journal of Medicine, 348: 1085–1095, 2003.*

FORBES, S.; BUI, S.; ROBINSON, B. R.; HOCHGESCHWENDER, U.; BRENNAN, M. B. *Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 98:4233-7, 2001.*

GANTZ, I.; SHIMOTO, Y.; KONDA, Y.; MIWA, H.; DICKINSON, C. J.; YAMADA, T. *Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, 200:1214–20, 1994.*

GANTZ, I.; YAMADA, T.; TASHIRO, T.; KONDA, Y.; SHIMOTO, Y.; MIWA, H. *et al.* Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by fluorescence in situ hybridisation. Genomics, 19:394–5, 1994.

GENRO, B. P. *Papel dos receptores VRI hipocamapais sobre a consolidação da memória.* Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Neurociências, UFRGS, Brasil, 2005.

GIULIANO, F. *Control of Penile Erection by the Melanocortinergic System: Experimental Evidences and Therapeutic Perspectives,* Journal of Andrology, 25(5), 2004.

GIULIANO, F.; RAMPIN, O. *Central neural regulation of penile erection.* Neuroscience Biobehavior Reviews, 24, 517-533, 2000.

GIULIANO, F.; CLÉMENT, P.; DROUPY, S.; ALEXANDRE, L.; BERNABÉ, J. *Melanotan-II: Investigation of the inducer and facilitator effects on penile erection in anaesthetized rat.* Neuroscience, 138(1):293-301, 2006.

GISPEN, W. H.; WIEGANT, V. M.; BRADBURY, A. F.; *et al.* *Induction of excessive grooming in the rat by fragments of lipotropin.* Nature, 1976.

GRIECO, P; BALSE P. M; WEINBERG D; MACNEIL T; HRUBY V. J; *D-Amino acid scan of gamma-melanocyte-stimulating hormone: importance of Trp (8) on human MC3 receptor selectivity.* Journal of Medicinal Chemistry, 43(26):4998–5002; 2000.

GURA, T. *Obesity drug pipeline not so fat.* Science, 299:849-52, 2003.

HADLEY, M. E.; HASKELL-LUEVANO, C. *The proopiomelanocortin system.* Annals of the New York Academy of Sciences. 885:1–21, 1999.

HADLEY, M. E.; DORR, R. T. *Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization.* Peptides, 27:921-30, 2006.

HASKELL-LUEVANO, C.; NIKIFOROVICH, G.; SHARMA, S. D. *et al.* *Biological and conformational examination of stereochemical modifications using the template melanotropin peptide, Ac-Nle-c[Asp-His-Phe-Arg-Trp-Ala-Lys]-NH₂, on human melanocortin receptors.* Journal of Medicinal Chemistry, 40, 1738–1748 1999.

HEATON, J. P.W.; MORALES, A.; ADAMS, M. A. *Melanocortins in Sexual Function.* Current Science Inc., 1:83–86, 2004.

HOLDER, J. R.; HASKELL-LUEVANO, C. *Melanocortin ligands: 30 years of structure-activity relationship (SAR) studies*. Medicinal Research Reviews, 24:325–56, 2004.

HUMPHREYS, M. H. *γ -MSH, sodium metabolism, and salt-sensitive hypertension*. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 286:417–430, 2004.

HUSZAR, D.; LYNCH, C. A.; FAIRCHILD-HUNTRESS, V.; DUNMORE, J. H.; FANG, Q.; BERKEMEIER, L. R. *et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice*. Cell, 88:131–41; 1997.

Impotence: National Institutes of Health Consensus Development Panel on Impotence. JAMA, 270: 83 ± 90, 1993.

IRANI, B. G.; HOLDER, J. R.; TODOROVIC, A.; WILCZYNSKI, A. M.; JOSEPH, C. G.; WILSON, K. R. *et al. Progress in the development of melanocortin receptor selective ligands*. Current Pharmaceutical, 10:3443–79, 2004.

JULIEN, A. *Central nervous system agents in the treatment of erectile dysfunction: how do they work?* 2001.

KING, S. H.; MAYOROV, A. V.; BALSE-SRINIVASAN, P.; HRUBY, V. J.; VANDERAH, T. W.; WESSELLS, H. *Melanocortin Receptors, Melanotropic Peptides and Penile Erection*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 7(11):1098–1106; 2007.

KORNER, J.; ARONNE, L. J. *Pharmacological Approaches to Weight Reduction: Therapeutic Targets*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89(6):2616–2621, 2004.

LEE, Y. S.; POH, L. K.; AND LOKE, K. Y. *A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 87:1423–1426, 2002.

LIST, J. F.; HABENER, J. F. *Defective Melanocortin 4 receptors in hyperphagia and morbid obesity*. New England Journal of Medicine, 348:1160-3, 2003.

MAHIQUES-SANTOS, L. *Melanotan*. Actas Dermosifiliográficas, 08.002, 2011.

MOREIRA, L. Y.; MARTINS, J. V. C.; OTOBONE, F; AUDI, E. A. *Metodologia de cirurgia estereotáxica para introdução crônica de cânulas guias no núcleo dorsal da rafe de ratos*. Arq. Apadec, 8, 2004.

MOUNTJOY, K. G.; ROBBINS, L. S.; MORTRUD, M. T.; CONE, R. D. *The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors.* Science, 257:1248–51, 1992.

MOUNTJOY, K. G.; MORTRUD, M. T.; LOW, M. J. *et al.* *Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in the neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain.* Molecular Endocrinology, 8:1298-1308, 1994.

O'RAHILLY, S. *Insights into obesity and insulin resistance from the study of extreme human phenotypes.* European Journal of Endocrinology, 47:435-41, 2002.

PFAUS, J. G.; PHILLIPS, A. G. *Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat.* Behaviour Neuroscience, 105:727–743, 1991.

RODRIGUES, A. M.; SUP LICY, H. L.; RADOMINSKI, R. B. *Controle neuroendócrino do peso corporal: implicações na gênese da obesidade.* Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, 47: 4, August, 2003.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B. *Interferência da moxidectina na motivação sexual e ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais.* Dissertação de Doutorado, São Paulo, 2007.

ROSELLI-REHFUSS, L.; MOUNTJOY, K. G.; ROBBINS, L. S. *et al.* *Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90:8856-8860, 1993.

SAWYER, T. K.; HRUBY, V. J.; DARMAN, P. S.; HADLEY, M. E. *[half-Cys4, half-Cys10]-alpha-Melanocystimulating hormone: a cyclic alpha-melanotropin exhibiting superagonist biological activity.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79:1751–5, 1982.

SCHIOTH, H. B.; MUCENIECE, R.; MUTULIS, F.; PRUSIS, P.; LINDEBERG, G.; SHARMA, S. D. *et al.* *Selectivity of cyclic [D-Nal7] and [D-Phe7] substituted MSH analogues for the melanocortin receptor subtypes.* Peptides, 18:1009–13, 1997.

SMITH, A. I.; FUNDER, J. W. *Proopiomelanocortin Processing in the Pituitary, Central Nervous System, and Peripheral Tissues.* Endocrine Reviews, 9: 159-179, 1988.

SLOMINSKI, A.; CONSTANTINO, R.; WORTSMAN, J.; PAUS, R.; LING, N. *Melanotropic activity of gamma MSH peptides in melanoma cells.* Life Science, 50, 1103-1108, 1992.

SPRUIJT, B. M.; HOGLUND, U.; GISPEN, W. H.; MEYERSON, B. J. *Effects of ACTH on male rat behavior in exploratory, copulatory and socio-sexual approach test.* Psyconeuroendocrinology, 10, 4:431-438, 1985.

STEPHENSON, J. *Knockout science: chubby mice provide new insights into obesity.* JAMA, 282:1507-8, 1999.

VAN DER KRAAN, M.; ADAN, R. A. H.; ENTWISTLE, M. L.; GISPEN, W. H.; BURBACH, J. P. H.; TATRO, J. B. *Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands.* Endocrinology, 139:2348-55, 1998.

VAISSE, C.; CLEMENT, K.; DURAND, E.; HERCBERG, S.; GUY-GRAND, B.; AND FROGUEL, P. *Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity.* Journal of Clinical Investigation, 106:253–262, 2000.

VEIGA, C. P.; MICZEK, K. A.; LUCION, A. B.; DE ALMEIDA, R. M. M. *Effect of 5HT1B receptor agonists injected in the prefrontal cortex on maternal aggression in rats.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40:825-830, 2007.

VERGONI, A. V., BERTOLINI, A., MUTULIS, F., *et al.* *Differential influence of a selective melanocortin MC4 receptor antagonist (HS014) on melanocortin-induced behavioral effects in rats.* European Journal of Pharmacology, 362:95 ± 101, 1998.

ZHOU, A.; BLOOMQUIST, B. T.; AND MAINS, R. E. *The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing.* Journal of Biological Chemistry, 268:1763–1769, 1993.

WESSELLS, H.; LEVINE, N.; HADLEY, M. E., DORR, R.; HRUBY, V. *Melanocortin receptor agonists, penile erection, and sexual motivation: human studies with Melanotan II.* International Journal of Impotence Research, 12, 2000.

WESSELLS, H.; HRUBY, V.; HACKETT, J.; HAN, G.; BALSESRINIVASAN, P.; VANDERAH, T. W. *AC-NLE-C[ASP-HIS-DPHE-ARG-TRP-LYS]-*

NH2 induces penile erection via brain and spinal melanocortin receptors.
Neuroscience, 118:755–762, 2003.

10. ANEXOS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
 Pró-Reitoria de Pesquisa
 Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP/UFGRS

Encaminhamento de Projeto de Pesquisa

Número do Projeto
 para uso do CEP/UFGRS

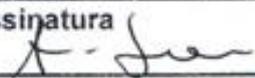
Ao encaminhar seu projeto, verifique se o mesmo contém os seguintes itens, ou equivalentes, redigidos em português, de acordo com a exigência do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (Resolução CNS196/96):

- () Título,
 - () Autor(es),
 - () Local de Origem,
 - () Local de Realização,
 - () Introdução,
 - () Objetivos,
 - () Material e Métodos,
 - () Cronograma,
 - () Orçamento
 - () Referências Bibliográficas
 - () Termo de Consentimento Informado
 - () Fontes de Financiamento
 - () Curriculum Vitae do Pesquisador Responsável (modelo CNPq)
- Entende-se por Pesquisador Responsável o professor, ou profissional com titulação equivalente, que assume a responsabilidade ética e metodológica pelo Projeto.

Título do Projeto

Efeitos da Injeção Intracerebroventricular de Derivados de Melanocortina sobre o Comportamento Sexual de Ratos Machos

Pesquisador Responsável

Nome Aldo Bolten Lucion		Assinatura 
Carteira de Identidade	CPF 124781197868	Vínculo: <input checked="" type="checkbox"/> Professor <input type="checkbox"/> Contratado <input checked="" type="checkbox"/> Aluno: <input checked="" type="checkbox"/> UFGRS <input type="checkbox"/> Outra instituição: _____



UFRGS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 107 (centro) - CEP 90046-900 - Porto Alegre, RS
Fone/Fax (51) 3308-3092 - Correio: ppgneuro@ufrgs.br - Página: <http://www.ufrgs.br/ppgneuro>

PARECER CIRCUNSTANCIADO

A Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Neurociências deste Instituto apreciou o projeto de pesquisa intitulado "Efeitos da Injeção Intracerebroventricular de Derivados de Melanocortina sobre o Comportamento Sexual de Ratos Machos" de responsabilidade do Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências deste Instituto, referente ao qual emitiu o seguinte parecer:

- (1) Trata-se de proposta de estudo controlado com evidente mérito científico, além de representar tema de grande relevância acadêmica e social; em particular, inclui entre seus objetivos [a] provar que os peptídeos isolados derivados do MT-I, forma longa do MT, não causam a ereção peniana em ratos machos, causando, portanto, somente efeitos isolados ao metabolismo energético; [b] Avaliar a ação individual dos peptídeos derivados de melanocortina (MT-I) sobre a preferência sexual de ratos machos entre uma fêmea receptiva e uma não-receptiva; [c] Avaliar a ação individual dos peptídeos derivados de melanocortina (MT-I) sobre o desempenho dos mesmos na ereção peniana;
- (2) o projeto possui uma Introdução bem fundamentada e tem objetivos e desenho experimental adequados ao estudo proposto; a metodologia é consistente e a infra-estrutura disponível no laboratório do responsável e no Programa, adequada;
- (3) o cronograma de execução prevê um período de 24 meses para o completamento do projeto;
- (4) conforme as informações disponíveis, todos os procedimentos de segurança e boas práticas de laboratório (que incluem o manuseio de reagentes, o descarte de resíduos, e os cuidados básicos de proteção do pesquisador) se adequam às resoluções da Câmara de Pesquisa da UFRGS;
- (5) cabe, por fim, salientar que o Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion, responsável pelo projeto, possui excelentes credenciais profissionais, como prova seu Curriculum Vitae, com boa produtividade científica e ampla experiência na formação de recursos humanos, o que garante a exequibilidade do projeto;

Sendo assim, esta Comissão é de parecer favorável à aprovação do presente projeto.

Parecer aprovado em

6/07/2010

Prof. Dra. Matilde Achaval
Coordenadora

Programa de Pós-Graduação
em Neurociências - UFRGS

